

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Développement de modèles expérimentaux invitro et validation d'anticorps dirigés contre le transporteur ABCBS

Collet, Romy

Award date:
2016

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



UNIVERSITE DE NAMUR
Faculté des Sciences

Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: +
32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be -
<http://www.unamur.be>



Développement de modèles expérimentaux *in-vitro* et validation d'anticorps dirigés contre le transporteur ABCB5

Mémoire présenté pour l'obtention du grade académique de master en
biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Collet Romy

Septembre 2016

Résumé

Le mélanome, cancer développé à partir des mélanocytes, est le cancer cutané le plus agressif. Les traitements du mélanome par immunothérapie et chimiothérapie sont associés à de faibles avantages thérapeutiques, notamment suite au développement de mécanismes de résistance. L'implication des ABC transporteurs dans la chimiorésistance a été mise en évidence par plusieurs études. Le transporteur ABC le plus caractérisé est ABCB1. Cependant, ce transporteur est faiblement exprimé au sein des cellules de mélanomes, au contraire du transporteur ABCB5. Il a été montré que ce transporteur est un marqueur de la progression du mélanome. Néanmoins ABCB5 est peu caractérisé.

Afin de comprendre le rôle d'ABCB5 dans la cellule saine et dans la tumeur, sa localisation subcellulaire doit être identifiée. Afin d'aboutir à ce projet, l'objectif de mon mémoire a consisté en la validation d'un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5 en western blot et en immunofluorescence.

Remerciements

La réalisation de mon mémoire a été possible grâce au soutien de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Je tiens tout d'abord à adresser toute ma gratitude à mon promoteur, Professeur Gillet, pour son accueil au sein du laboratoire de physiologie moléculaire du cancer mais aussi pour sa patience lors des corrections de mon manuscrit.

Je voudrais aussi remercier toute l'équipe du laboratoire de biologie moléculaire du cancer. Tout d'abord, un grand merci à mes deux collègues de bureau Géraldine Sana et Marie Fourrez. Grâce à leur disponibilité et leur bonne humeur, la réalisation de mon mémoire a été un réel moment de plaisir. Plus particulièrement Merci à Géraldine Sana qui m'a encadrée durant ces dix mois et qui malgré ses journées débordées de travail trouvait toujours un moment pour me soutenir et répondre à mes questions avec le sourire. Merci également à Jean-Martin Billard pour son aide et ses conseils précieux.

Je désire également remercier les personnes du laboratoire de chimie physiologique et du laboratoire de génétique moléculaire pour le matériel que je leur ai emprunté mais aussi pour leur accueil. Je tiens plus particulièrement à remercier Marielle Boonen pour son aide et ses conseils concernant la validation d'un anticorps polyclonal dirigé contre la forme typique d'ABCB5 en western blot. Je tiens également à remercier Noëlle Ninane et Catherine Demazy, membres de l'unité de recherche en biologie cellulaire pour leur disponibilité, leur patience et leurs conseils pour les multiples observations au microscope confocal.

Enfin, je voudrais exprimer ma reconnaissance à mes proches qui m'ont apporté leur soutien moral durant ces dix mois. Merci à mes amis de master 1 BBMC pour les nombreux moments que l'on a passé ensemble pour se décontracter mutuellement. Merci à ma famille, mes parents ainsi que mon frère et ma sœur d'avoir supporté mon humeur mais aussi d'avoir été à mes petits soins afin que je me sente bien. Merci aussi à Markus d'avoir écouté les soucis que je rencontrais au cours de mes journées et de m'avoir raisonnée durant des soirées entières.

Table des matières

I)	Introduction.....	7
1)	La peau	7
2)	La peau et les cancers associés	7
3)	La photocarcinogenèse	8
4)	Le mélanome	9
4. 1.	Introduction.....	9
4. 2.	La physiologie des mélanocytes	9
4. 3.	Impact des UV sur la mélanogenèse	12
4. 4.	Le développement du mélanome.....	13
4. 5.	Les gènes impliqués dans la mélanomagenèse et leur fonction physiologique	15
4. 6.	Classement des mélanomes et pronostics	17
5)	Les traitements.....	19
5. 1.	L'exérèse chirurgicale	19
5. 2.	L'immunothérapie	19
5. 3.	La chimiothérapie	19
5. 4.	La thérapie ciblée	20
6)	La chimiorésistance du mélanome.....	21
7)	Les ABC transporteurs	22
7. 1.	ABCB5	24
7. 2.	Les ABC transporteurs : cibles pharmacologiques	25
II)	Objectifs du mémoire.....	26
III)	Matériels et méthodes	27
1)	Culture cellulaire	27
2)	Acquisition d'une lignée cellulaire négative pour l'expression d'ABCB5	27
2.1.	Transfection cellulaire avec des shARNs	27
2.2.	Transfection cellulaire	27
2.3.	Contrôle du niveau d'expression des transcrits ABCB5 par PCR quantitative	28
3)	Validation d'un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5	29
3. 1.	Homogénéisation cellulaire.....	29
3.2.	Western blot.....	29
3.3.	Immunoprécipitation.....	29
3.4.	Marquage radioactif.....	30

3.5. Immunofluorescence.....	30
IV) Résultats	32
1) Acquisition d'une lignée cellulaire négative pour l'expression d'ABCB5	32
2) Validation d'un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5.....	33
2.1 Validation de l'anticorps polyclonal Rockland.....	33
2.2 Validation de l'anticorps polyclonal ABCAM	34
2.3 Validation d'un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5 en immunofluorescence.....	35
V) Discussion	37
1) Acquisition d'une lignée cellulaire négative pour l'expression d'ABCB5	37
2) Validation d'un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5.....	38
2.1 Validation d'un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5 en western blot	38
2.2 Validation d'un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5 en immunofluorescence.....	39
VI) Conclusion	40

I) Introduction

1) La peau

L'épiderme est constitué de quatre couches cellulaires. La plus profonde est la couche basale. Elle est majoritairement composée de kératinocytes, cellules responsables du renouvellement mitotique de la peau, et de mélanocytes, cellules pigmentaires. Au-dessus de la couche basale se trouve la couche épineuse, constituée d'une superposition cellulaire, essentiellement composée de kératinocytes mais également de cellules de Langerhans et de Merkel, respectivement cellules dendritiques et mécanorécepteurs. Les kératinocytes de la couche épineuse sont caractérisés par la présence de desmosomes, prolongements cytoplasmiques, et de corps lamellaires, granules riches en lipides. Au-dessus de la couche épineuse se trouve la couche granuleuse caractérisée par la superposition de kératinocytes remplis de kératohyaline, précurseur de la kératine. La couche la plus superficielle est la couche cornée. Elle est caractérisée par la superposition de kératinocytes pratiquement dépourvus d'organites et contenant des filaments de kératine. Les cellules de cette dernière couche sont éliminées au même rythme qu'elles sont renouvelées grâce à l'activité mitotique des deux premières couches. Sous l'épiderme se trouve le derme, principalement constitué de tissus conjonctifs dont le collagène de type I et les fibres élastiques, de terminaisons nerveuses et de vaisseaux sanguins (**Figure 1**) (consulter revues ^{1,2}).

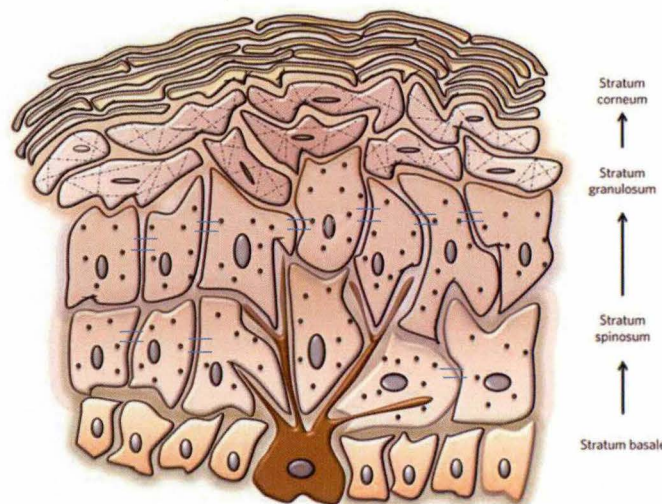


Figure 1 : Les différentes couches de l'épiderme et leur composition cellulaire. Du bas vers le haut : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (source image³).

2) La peau et les cancers associés

Il existe trois types de cancers cutanés : le mélanome, se développant à partir des mélanocytes et deux cancers cutanés non-mélanotiques (CCNM) comprenant le carcinome basocellulaire, se développant à partir des kératinocytes de la couche basale et le carcinome spinocellulaire se développant à partir des kératinocytes de la couche épineuse⁴. Ces deux types de cancers représentent respectivement 75 et 25% des CCNM et présentent un faible taux de mortalité⁵.

Le mélanome, quant à lui, représente moins de 5% des cancers cutanés⁶. Néanmoins, il est caractérisé comme le cancer cutané le plus agressif et est associé à un taux de mortalité élevé⁷.

Le carcinome spinocellulaire se développe majoritairement au niveau des zones exposées aux UV telles que le visage, les oreilles et les membres. Le développement de carcinomes spinocellulaires serait la conséquence d'une exposition aux UV cumulative jusqu'à l'âge adulte. Au contraire, le mélanome et le carcinome basocellulaire ne se développent pas au niveau des zones fortement exposées aux UV. Néanmoins, une exposition solaire excessive ainsi que la survenue de coups de soleil lors de l'enfance uniquement semble être un facteur de risque important pour le développement de ces derniers⁴.

En Europe, plus de 1 million et 20 mille décès, respectivement dus aux cancers non-mélanotiques et mélanotiques, étaient estimés en 2012⁸. L'incidence des cancers cutanés est en constante augmentation. L'évolution de la carcinogenèse peut, en partie, être reliée à l'augmentation de l'exposition aux UV par la destruction de la couche d'ozone mais aussi par l'extension des activités extérieures de l'homme⁹. Une multitude d'autres facteurs, considérés comme carcinogènes, sont également responsables du développement de cancers cutanés¹⁰. Seule la photocarcinogenèse, cause primaire du développement des cancers cutanés, est traitée dans mon manuscrit.

3) La photocarcinogenèse

Les rayons solaires atteignant la terre comprennent les ultra-violets (UV) (λ : 200-400 nm), les rayons visibles (λ : 400- 760 nm) et les infrarouges (λ : 760-10⁶ nm). Les UV sont les rayons lumineux les plus énergétiques et sont subdivisés en UVA (λ : 320-400 nm), UVB (λ : 290-320 nm) et UVC (λ : 100-290 nm). Les UVA représentent 95% des UV qui atteignent la terre alors que les UVB en représentent 5%¹¹. Les UVC, quant à eux, sont absorbés par la couche d'ozone. Malgré les effets bénéfiques des UV, tels que la synthèse de vitamine D ou la stimulation d'hormones du cycle circadien, l'exposition aux UV peut être néfaste pour la peau¹²⁻¹⁴. En effet, les expositions aiguës au soleil ont pour conséquences les coups de soleil, l'inflammation et le bronzage alors que les expositions chroniques au soleil ont pour conséquences le photovieillissement, l'immunosuppression et la photocarcinogenèse¹⁵.

Lors de l'exposition de la peau aux UV, ces derniers peuvent réagir de deux manières différentes avec les biomolécules aux détriments de l'ADN. Premièrement, les UV peuvent interagir directement avec l'ADN et créer des modifications structurelles telles que la formation de dimères de pyrimidines et cytosines ou autres photoproduits. Deuxièmement, les UV peuvent interagir indirectement avec certaines biomolécules intracellulaires telles que le NADH, la mélanine ou l'acide urocanique qui transfèrent l'énergie des rayons UV à des molécules chromophores contenant de l'oxygène. Ce processus forme des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) responsables des dommages créés à l'ADN¹¹.

Les UVB sont très énergétiques, ils pénètrent le derme en profondeur et sont directement responsables des dommages créés à l'ADN alors que les UVA sont moins énergétiques et provoquent des dommages à l'ADN de manière indirecte¹¹. Il a été démontré que l'induction de carcinomes spinocellulaires par irradiation était 1000X plus fréquente lors de l'utilisation d'UVB plutôt que les UVA. Les UVB sont dès lors perçus comme les principaux agents carcinogènes¹⁶.

Les dommages de l'ADN créés par les UV sont généralement réparés par la surexpression de P53, un facteur de transcription responsable de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'activation des systèmes de réparation tels que BER (base excision repair) et NER (nucleotides excision repair). Lorsque les dommages sont trop sévères, la voie apoptotique est activée et les cellules endommagées sont éliminées. Néanmoins, des mutations géniques peuvent survenir lorsque les systèmes de réparation font défaut⁴. La mutation de gènes suppresseurs de tumeurs ou de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire suite à l'exposition aux UV est fortement liée au développement de cancers cutanés⁴.

4) Le mélanome

4. 1. Introduction

Le mélanome est un cancer cutané qui se développe à partir des mélanocytes¹⁷. Le phototype de la peau est un facteur de risque majeur menant au développement de ce dernier¹⁸. Parallèlement, l'incidence du mélanome varie géographiquement. En effet, il est extrêmement rare dans les populations africaines, caractérisées par un phototype élevé, alors qu'il est fréquent dans les populations caucasiennes, caractérisées par un phototype faible¹⁹. Le risque de développer des mélanomes varie également en fonction du nombre et de la taille des névus, plus couramment appelés les grains de beauté. En effet, le risque de développer un mélanome est 1,5 fois plus élevé chez les personnes possédant entre 11 et 25 névus et semble doubler tous les 25 névus supplémentaires²⁰. La probabilité de développer un mélanome augmente également considérablement lorsque le nombre de névus dysplasiques est supérieur à 4²¹. Un névus est défini comme dysplasique lorsqu'il présente un diamètre supérieur à 6 mm, des bords irréguliers, une couleur hétérogène et une asymétrie²².

Bien que 95% des mélanomes cutanés se développent aléatoirement suite à l'exposition aux UV, 5% des mélanomes sont familiaux²³. Trois gènes ont été identifiés comme acteurs majeurs dans le développement de mélanomes cutanés familiaux : CDKN2A (cycline dépendant kinase inhibiteur 2A), CDK4 (Cyclin dépendant kinase 4) et MC1-R (melanocortin-1-receptor). Le plus caractérisé de ces gènes est CDKN2A. En effet, plus de 25% des mélanomes contiennent une mutation génique qui résulte à la perte de fonction de ce gène²³. L'implication de ces gènes dans la mélanomagenèse est évoquée prochainement.

4. 2. La physiologie des mélanocytes

Les mélanocytes proviennent embryologiquement des cellules de la crête neurale. Ces dernières appartiennent à un groupe de cellules mésenchymateuses qui quitte la plaque neurale lors de la neurulation. Dans un premier temps, les cellules de la crête neurale sont totipotentes, elles se spécifient par la suite en une lignée cellulaire définie en fonction de leur direction de migration^{24,25}. Le développement embryonnaire des mélanocytes est dirigé par l'activation de voies de signalisation. En effet, les voies Notch et Wnt semblent importantes dans le devenir des cellules de la crête neurale en mélanocytes et la voie Snail/Slug semble favoriser la migration des mélanocytes et maintenir la viabilité de ces derniers²⁶.

Les mélanocytes sont majoritairement responsables de la synthèse de la mélanine déterminant la pigmentation et le phototype de la peau²⁷. La mélanine synthétisée par les mélanocytes est transférée aux kératinocytes afin d'absorber les rayons UV et limiter tout dommage à l'ADN suite à l'exposition de la peau aux UV. Deux types de mélanine sont synthétisés : l'eumélanine et la phéomélanine. L'eumélanine est plus foncée et plus protectrice vis-à-vis des UV que la

phéomélanine²⁸. C'est le rapport eumélanine/phéomélanine qui détermine le phototype de la peau²⁸.

La mélanine est produite à partir de la tyrosine. Dans un premier temps, la tyrosine est hydroxylée en L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) puis oxydée en DOPAquinone. Ensuite, si la cystéine est présente, la DOPAquinone réagit avec cette dernière formant du cysteinylDOPA qui oxydé et polymérisé forme la phéomélanine. Par contre, en absence de cystéine, la DOPAquinone subit une cyclisation spontanée en DOPAchrome. Pour terminer, soit le DOPAchrome perd spontanément son acide carboxylique formant du 5,6-dihydroxyindole (DHI) qui est polymérisé et oxydé pour former l'eumélanine, soit la formation d'eumélanine est catalysée par les enzymes TRP1 et TRP2 (Tyrosinase Related Proteins) passant par l'intermédiaire de DHICA (DHI-2-carboxylic acid) et DHICA-mélanine (*Figure 2*)²⁷.

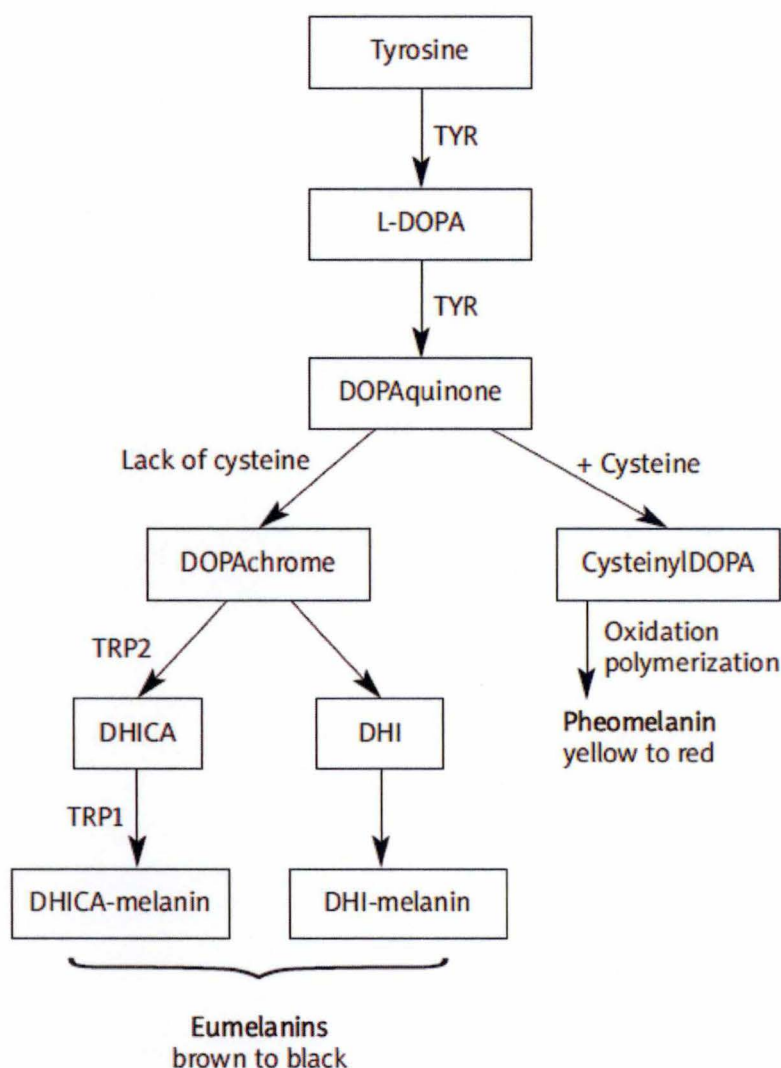


Figure 2 : Voie de synthèse de la mélanine. Deux types de mélanine sont produits : l'eumélanine et la phéomélanine. Ces deux types de mélanine sont produits à partir de la tyrosine par des enzymes tyrosinases et selon la disponibilité en cystéine (source image²⁷).

Les intermédiaires lors de la synthèse de la mélanine sont des agents cytotoxiques. C'est pourquoi la synthèse de la mélanine se déroule au sein des mélanosomes, organelles spécifiques des mélanocytes très semblables aux lysosomes et probablement originaires du réticulum endoplasmique. En plus de la compartimentation créée par les mélanosomes, les mélanocytes ont une synthèse augmentée de la protéine anti-apoptotique BCL-2^{29,30}.

Les mélanosomes passent par quatre stades de développement. Le premier est caractérisé par de petites vésicules dépourvues de matrice fibrillaire. Le deuxième est caractérisé par une matrice fibrillaire principalement formée de la protéine GP100 et par l'acquisition des tyrosinases, enzymes de synthèse de la mélanine. Le troisième est caractérisé par la capacité des mélanosomes à synthétiser de la mélanine et le quatrième correspond à des mélanosomes remplis de mélanine^{31,32}. Ce sont les mélanosomes qui assurent le transport de la mélanine à partir des mélanocytes aux kératinocytes³².

Afin d'atteindre les kératinocytes, les mélanosomes sont transportés jusqu'à l'extrémité des dendrites des mélanocytes par les microtubules et les protéines motrices associées : la dynéine et la kinésine³³. Le mécanisme par lequel les mélanosomes atteignent l'espace périnucléaire des kératinocytes n'est pas encore bien déterminé. Les mélanosomes semblent être exocytés dans l'espace intercellulaire et phagocytés par les kératinocytes voisins (*Figure 3*)³⁴. Cependant, l'observation de filopodes chez les mélanocytes par photographie de haute résolution envisage l'hypothèse que ces derniers puissent fusionner avec les kératinocytes voisins afin de leurs transférer les mélanosomes³⁵.

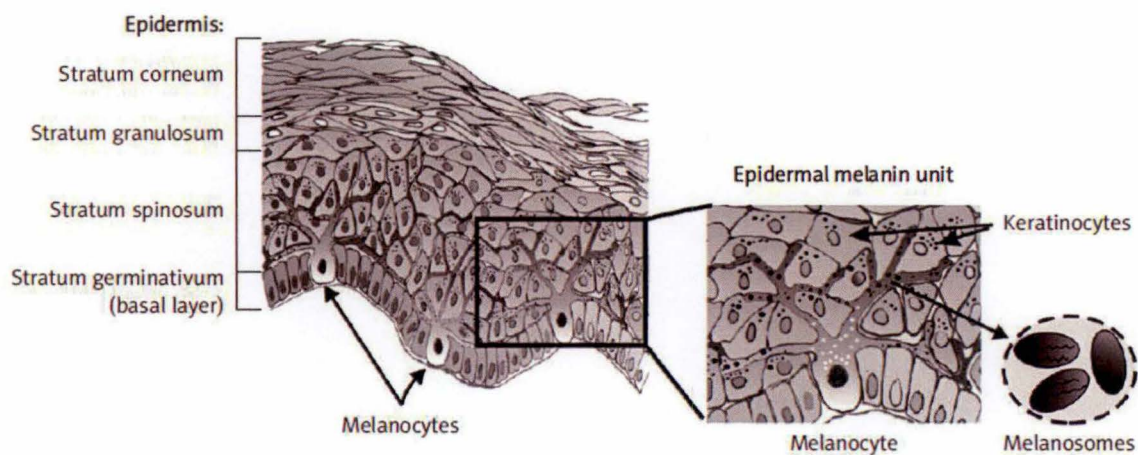


Figure 3 : Localisation des mélanosomes dans l'épiderme. Les mélanosomes semblent être exocytés par les mélanocytes dans l'espace intercellulaire et phagocytés par les kératinocytes voisins (source image³⁴).

Le développement des mélanocytes à partir des cellules de la crête neurale ainsi que la mélanogenèse impliquent la communication entre kératinocytes et mélanocytes par l'intermédiaire de facteurs de croissance menant principalement à l'activation du facteur de transcription MITF (microphthalmia-associated-transcription-factor) et la voie MAPK

(mitogen-activated-protein-kinases). MITF et MAPK sont respectivement impliqués dans la mélanogénèse et la prolifération des mélanocytes³⁶⁻⁴⁴ (*figure 4*).

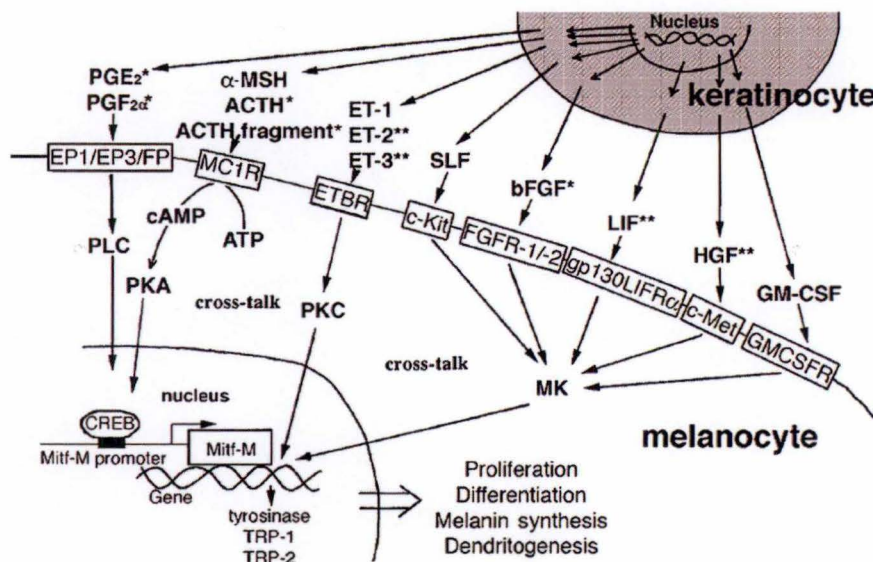


Figure 4 : Rôle des facteurs délivrés par les kératinocytes dans la mélanogénèse. Les prostaglandines PGE₂ et PGF₂, les hormones α-MSH et ACTH et les endothélines ET1, ET2 et ET3, en liant respectivement leur récepteur spécifique en surface des mélanocytes, activent MITF par l'intermédiaire de la voie de la Phospholipase C, la protéine kinase A ou la protéine kinase C. L'activation de MITF mène à l'augmentation de la mélanogénèse et de la dendritogénèse des mélanocytes. Les facteurs SLF, bFGF, LIF, HGF et GM-CSF activent la voie MAPK menant à la prolifération des mélanocytes lorsqu'ils lient leur récepteur spécifique en surface des mélanocytes. (source image³⁴).

4. 3. Impact des UV sur la mélanogénèse

L'exposition de la peau aux UV induit d'une part l'augmentation de la mélanogénèse et d'autre part la prolifération des mélanocytes^{45,46}. Ces deux processus sont reliés à l'augmentation de la libération de facteurs paracrines par les kératinocytes. En effet, une augmentation de l'expression de BFGF, ET-1, ACTH, α-MSH, PGE₂, PGF₂ et NGF a été démontrée après l'exposition des kératinocytes aux UV (*Figure 4*)⁴⁷. L'augmentation de la mélanogénèse est également la conséquence de la transcription augmentée de MITF. En effet, les dommages causés à l'ADN par les UV semblent favoriser l'expression de P53, impliqué dans l'induction de la transcription de MITF par l'intermédiaire de POMC, α-MSH, l'adénylate cyclase, la protéine kinase A (PKA) et CREB (*Figure 5*)⁴⁸.

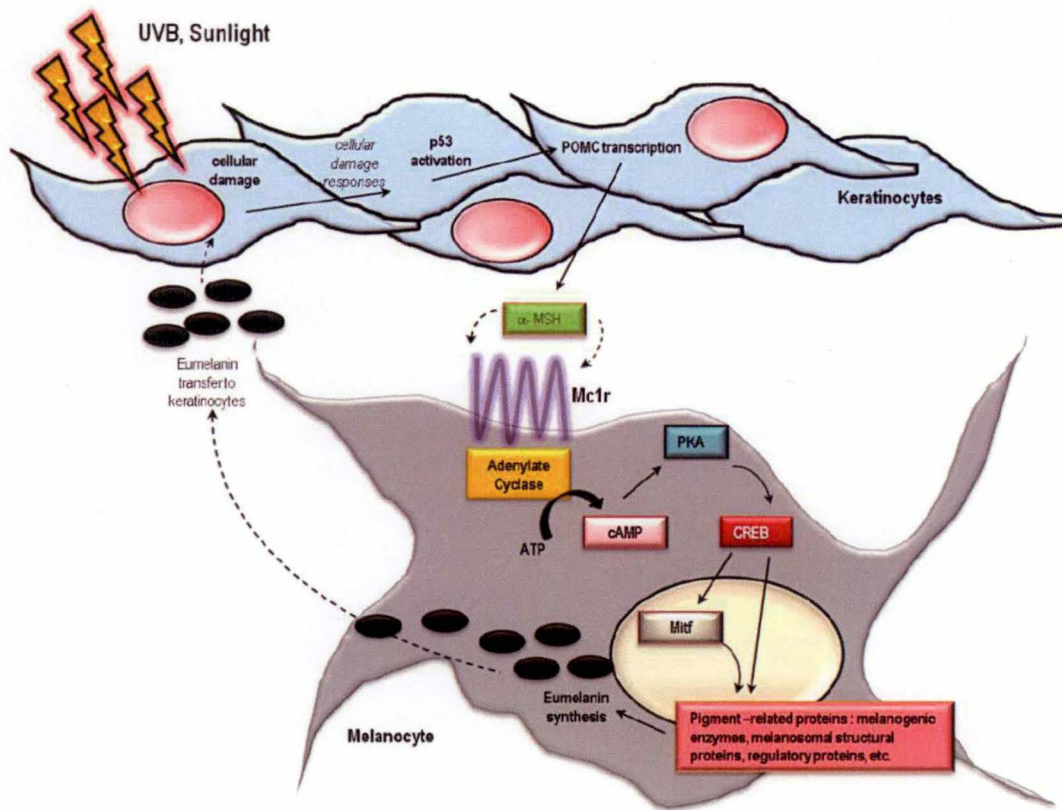


Figure 5 : Régulation de la mélanogenèse par les UV. Les dommages cellulaires causés par les UV activent P53 qui favorise la transcription du gène POMC responsable de la sécrétion de l'hormone α -MSH. Cette dernière, en liant son récepteur, MC1-R, active la transcription de MITF par l'intermédiaire de l'adénylate cyclase, la protéine kinase A et CREB. L'augmentation de la transcription de MITF augmente la mélanogenèse. (source image⁴⁸).

4. 4. Le développement du mélanome

Le modèle de Clark décrit les modifications menant au développement du mélanome à partir de mélanocytes sains. Ce modèle est divisé en 5 étapes¹⁷.

La première étape est le développement du mélanocyte en névus (**Figure 6**)¹⁷. Le névus, plus couramment appelé grain de beauté, est une tache brunâtre cutanée résultant de la prolifération des mélanocytes et de l'augmentation de la mélanogenèse⁴⁹. Certaines études ont démontré l'importance de l'activation constitutive de la voie de signalisation MAPK dans le développement de névus à partir de mélanocytes¹⁷. Ce phénomène a été associé à la mutation des protooncogènes NRAS et BRAF respectivement dans 15 et 50% des mélanomes⁵⁰. Néanmoins, il est rare que le névus progresse en mélanome⁵¹. Cela est dû à l'induction de la sénescence par l'activité des oncogènes⁵². D'autres mutations sont donc nécessaires pour qu'un névus progresse en mélanome¹⁷.

La deuxième étape, l'immortalisation des mélanocytes, est principalement liée à la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs tels que PTEN, P53 et CDKN2A (p16 et p14). Ce

processus mène à la troisième étape du développement d'un mélanome, la croissance radiale, caractérisée par l'invasion de l'épiderme par les mélanocytes immortels¹⁷.

La quatrième étape est la croissance verticale. Durant cette phase, les mélanocytes acquièrent la capacité d'envahir le derme¹⁷. Des modifications perturbatrices de l'adhésion cellulaire ont été reliées à cette étape. En effet, il a été démontré que la transition de la direction de l'invasion était associée à la perte de l'expression des E-cadhérines et du gain de l'expression des N-cadhérines⁵³. Ces dernières permettent l'invasion du derme par l'interaction avec d'autres N-cadhérines localisées sur des cellules dermiques telles que les fibroblastes et les cellules de l'endothélium vasculaire⁵⁴. L'invasion cellulaire verticale est également reliée à l'expression de l'intégrine $\alpha V\beta 3$. Cette dernière active la protéine collagénase MMP2 responsable de la dégradation de la membrane basale^{55,56}. La cinquième et dernière étape est la formation de métastases caractérisée par l'atteinte des vaisseaux sanguins et lymphatiques par les cellules cancéreuses¹⁷.

Néanmoins, uniquement 36% des mélanomes se développent à partir d'un névus préexistant⁵⁷. Plusieurs études ont démontré l'existence de cellules souches dans les mélanomes cutanés⁵⁸. Lors de biopsies de patients, le marqueur cellulaire de cellules souches CD133 a été identifié au sein des mélanomes. Les cellules souches semblent avoir un rôle majeur dans la mélanomagenèse. En effet, il a également été démontré qu'en présence de cellules exprimant ce marqueur, la tumorigenèse du mélanome était augmentée⁵⁹. Ces cellules sont identifiées comme les cellules souches tumorales, elles constituent une sous-population de cellules capable de renouvellement et différenciation cellulaire. L'induction de mutations au sein du génome de cellules souches somatiques adultes et de cellules progénitrices capables de réactiver des voies de signalisation impliquées dans l'auto-renouvellement ou la dédifférenciation cellulaire pourrait être impliquée dans le développement de cellules souches tumorales⁶⁰.

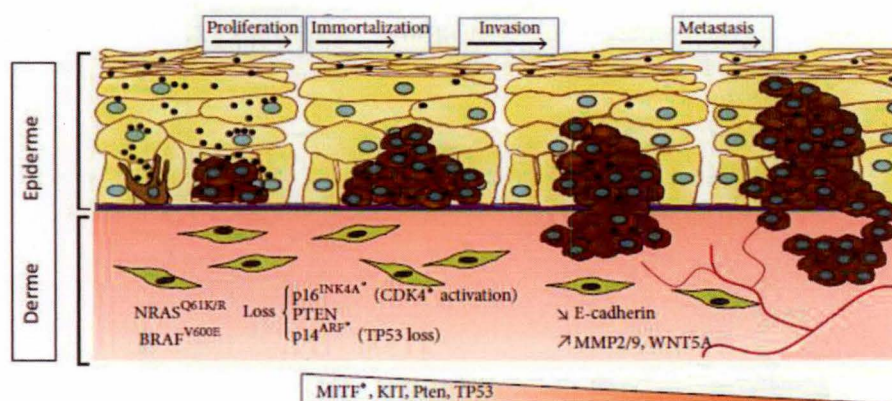


Figure 6 : Altérations génétiques menant au développement de mélanomes. Les mutations de BRAF et NRAS sont impliquées dans la formation de névus (phase I). Néanmoins, cela n'est pas suffisant. En effet, les mutations de gènes suppresseurs de tumeurs tels que p14, p16, P53 et PTEN sont également nécessaires pour l'immortalisation (phase II) et l'invasion des mélanocytes dans l'épiderme (phase III). L'invasion du derme nécessite la modification de l'expression de molécules d'adhésion telles que les cadhérines et les intégrines (phase IV). Les métastases sont caractérisées par l'atteinte des vaisseaux sanguins et lymphatiques par les cellules cancéreuses (phase V). La diminution de l'expression des gènes MITF et KIT, acteurs de la mélanogenèse, semble également importante dans le développement de mélanomes à partir d'un névus. (source image¹⁸).

4. 5. Les gènes impliqués dans la mélanomagenèse et leur fonction physiologique

4.5.1. Acteurs de la voie MAPK

Au sein de la voie MAPK, l'interaction facteur de croissance/récepteur à tyrosine kinase transmembranaire est suivie par la dimérisation et la transphosphorylation du récepteur. Suite à ce processus, ce dernier convertit la protéine RAS-GDP en sa forme active, RAS-GTP²³ (*Figure 7*).

Premièrement, la forme active de RAS est capable de phosphoryler la protéine RAF-GDP en RAF-GTP phosphorylant par la suite MEK-GDP en MEK-GTP. Dans ce cas, MEK-GTP phosphoryle ERK-GDP en ERK-GTP. Une fois activé, ERK est transloqué vers le noyau afin de favoriser la formation du complexe de cyclines 4/6 et D1, menant à la prolifération cellulaire (*Figure 7. a*)^{23,63}.

Deuxièmement, l'activation de RAS favorise l'activité de la phosphatidylinositol-3-phosphate kinase (PIP3K), enzyme responsable de l'activation de la voie AKT par la production de PIP3. La protéine PDK1 peut également activer la voie AKT, indépendamment de RAS, par phosphorylation. L'activation de la voie AKT peut d'une part inhiber la protéine TSC (tuberous sclerosis protein), régulant la traduction protéique²³. Néanmoins ce processus n'est pas encore compris⁶¹. D'autre part, l'activation de cette dernière peut activer la voie mTOR (mammalian target of rapamycin) menant à l'activation de deux protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire, 4EBP1 et P70S6K. Le rôle de l'activation de la voie mTOR par RAS est encore sujet d'étude. La voie mTOR peut également être activée par la protéine Rheb, régulateur négatif de BRAF²³. L'activation de la voie AKT est limitée lorsque la protéine PTEN est activée. Cette dernière est une phosphatase qui convertit le phosphatidylinositol-3-phosphate (PIP3) en phosphatidylinositol-2-phosphate (PIP2)⁶².

4.5.2. Le gène CDKN2A

Le gène CDKN2A a un rôle majeur dans la régulation de la prolifération cellulaire. Ce dernier code pour deux protéines : p16^{INKA4} et p14^{ARF}. p16^{INKA4} arrête le cycle cellulaire entre les phases G1 et S de la réplication lorsque les cellules possèdent un ADN endommagé. En fait, p16^{INKA4} lie les cyclines CDK4 et CDK6 (cyclin-dépendant kinase 4 et 6) afin d'empêcher la formation du complexe CDK4/CDK6/CD1 et la phosphorylation de Rb (rétinoblastome). De cette manière, le rétinoblastome reste lié à la protéine E2F et ne peut activer l'expression de gènes codant pour des protéines nécessaires à la phase de réplication de l'ADN (S). p14^{ARF} favorise l'arrêt du cycle cellulaire et la mort cellulaire lors de la présence d'ADN endommagé et d'oncogènes activés. En fait, p14^{ARF} lie la protéine MDM2 (mouse double minute 2) afin d'empêcher que celle-ci favorise la dégradation de P53, facteur de transcription favorisant la transcription de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose²³ (*Figure 7. b*).

Les mutations observées au niveau des gènes CDKN2A et NRAS chez les patients développant un mélanome non familial montrent une signature UV, caractérisée par la présence de dimères de pyrimidines⁶⁴.

4.5.3. Le gène MITF

MITF est un facteur de transcription favorisant l'expression de gènes impliqués dans la mélanogenèse et la différenciation des mélanocytes. Ce dernier est activé par différents signaux intracellulaires. Le signal intracellulaire majeur activant la transcription de MITF est l'interaction de α -MSH, hormone libérée par les kératinocytes, avec son récepteur

membranaire, MC1-R. Une fois transcrit, MITF transloque dans le cytoplasme où il est activé par ERK-GTP, kinase de la voie MAPK activée par l'interaction du récepteur membranaire C-KIT avec son ligand, et favorise l'expression de gènes impliqués dans la mélanogenèse et la dendritogenèse (Figure 7. c)^{17,23}.

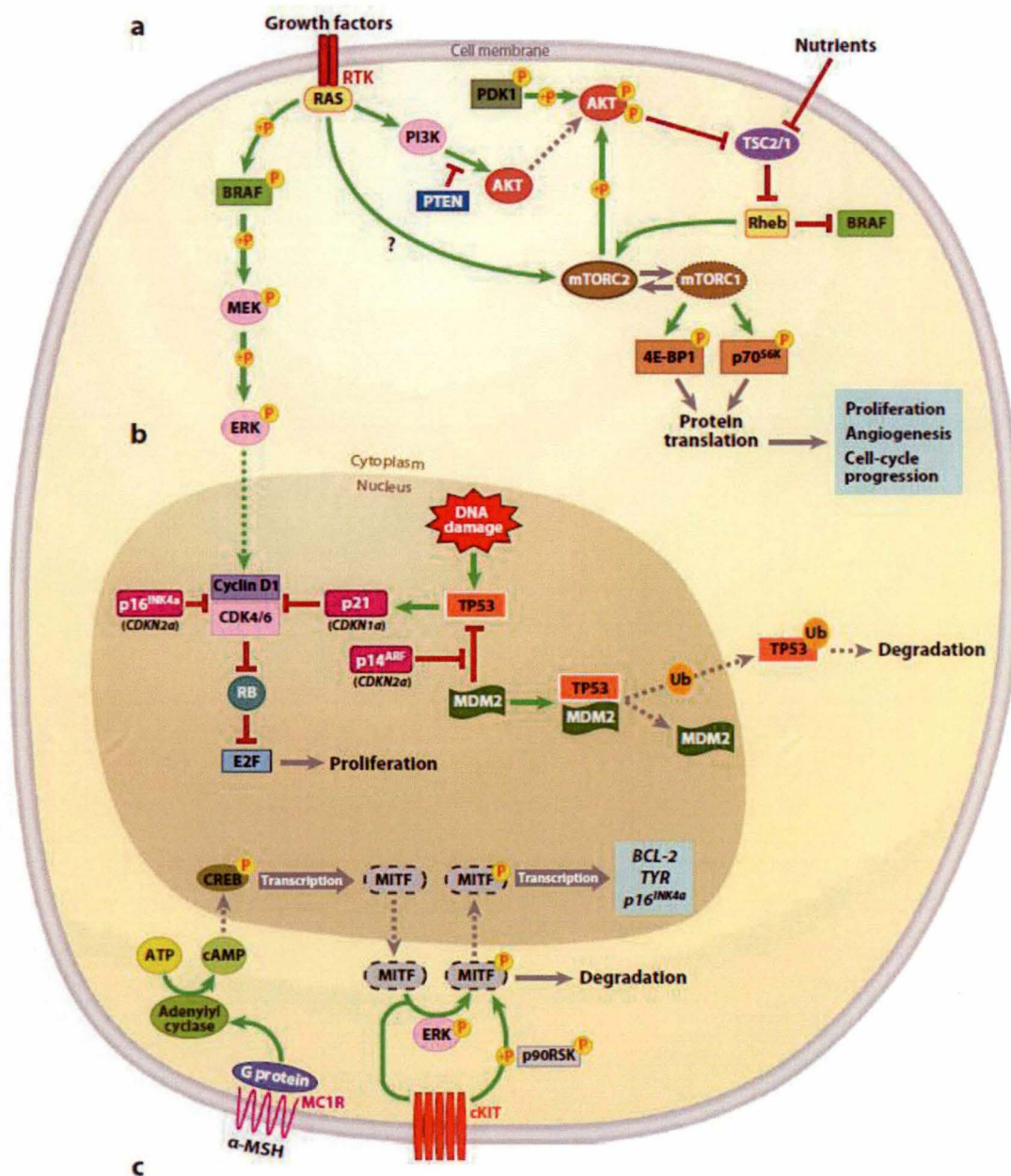


Figure 7 : Les gènes impliqués dans la mélanomagenèse et leur fonction physiologique. a. Voies MAPK et AKT. b. CDKN2A : P16^{INK4a} et P14^{ARF}. c. MITF. (Source image²³)

4. 6. Classement des mélanomes et pronostics

Les différents stades du mélanome peuvent être identifiés par la classification TMN qui se base sur 3 critères majeurs : T, N et M (*Table 1*)⁶⁵. Ce classement a été révisé en 2001 par le comité américain contre le cancer et appliqué en 2010⁶⁶.

Le critère T classe premièrement, les mélanomes selon leur épaisseur. Plus l'épaisseur de la tumeur est importante moins le pronostic est bon. L'épaisseur est < 1 mm pour les mélanomes T1, 1-2 mm pour les mélanomes T2, 2-4 mm pour les mélanomes T3 et > 4 mm pour les mélanomes T4. Le taux de survie à 5 ans est de 93% pour les patients atteints de mélanomes T1 et descend à 39% pour les patients atteints de mélanomes T4. Ensuite, les mélanomes sont classés selon la présence d'ulcération et le taux mitotique. Une corrélation entre un taux mitotique élevé et une espérance de vie faible a été démontrée par les données fournies par le comité américain contre le cancer. Les mélanomes sans ulcération et un taux mitotique < 1 mm appartiennent à la classe T1-4a et les mélanomes présentant des ulcérations et un taux mitotique > 1 mm font partie de la classe T1-4b. L'espérance de survie à 5 ans est respectivement de 79% et 71% pour les patients atteints de mélanomes T3a et T4a alors qu'elle diminue à 68% et 53% pour les patients atteints de mélanomes T3b et T4b⁶⁷.

Le second critère, N, informe premièrement sur la présence et le nombre de nodules métastatiques. La classe N0 reprend les tumeurs ne présentant pas de nodule. Les tumeurs présentant des nodules sont classées dans les catégories N1, N2 et N3 lorsqu'elles présentent respectivement 1, 2-3 et > 4 nodules métastatiques. Le taux de survie à 5 ans passe de 70% pour les patients atteints de mélanomes N1 à 39% pour les patients atteints de mélanomes N3. Ensuite, le critère N informe sur la présence et l'importance des métastases. Les mélanomes présentant des micrométastases (< 2 mm²) sont classés dans la catégorie Na, ceux présentant des macrométastases (> 2 mm²) dans la catégorie Nb et ceux présentant des métastases en transit dans la catégorie Nc⁶⁷.

Le dernier critère, M, classe les mélanomes selon la localisation des métastases distantes. Les mélanomes M0 ne présentent pas de métastases distantes contrairement aux mélanomes M1. Ces derniers sont classés en différentes catégories selon la localisation des métastases. Les mélanomes M1a présentent des métastases cutanées et sous-cutanées. Les mélanomes M1b présentent des métastases au niveau des poumons et les mélanomes M1c présentent des métastases à tout autre endroit⁶⁷.

Les mélanomes sont répertoriés en 4 stades selon leur score TMN. Les mélanomes des catégories T0N0M0-T2aN0M0 font partie du premier stade. Les mélanomes des catégories T2bN0M0-T4bN0M0 font partie du second stade. Les mélanomes des catégories T4BN0M0-T4N3M0 font partie du troisième stade. Les mélanomes de catégorie T4N3M1 font partie du quatrième stade⁶⁷ (*Table 2*).

Les mélanomes de stade I et II ont un bon pronostic. Les taux de survie relatifs à 5 ans de ces derniers sont respectivement de 89% à 95% et 45% à 77%. L'espérance de vie décroît néanmoins avec la présence de métastases. En effet, chez les patients atteints de mélanomes de stade III et IV, les taux de survie relatifs à 5 ans sont respectivement de 27% à 69% et de 9% à 15%⁶⁵.

Critère T	Epaisseur	Statut d'ulcération et taux mitotique
T1	< 1 mm	a= sans ulcération/ taux mitotique <1 mm b= avec ulcération / taux mitotique < 1 mm
T2	1-2 mm	
T3	2-4 mm	
T4	>4 mm	
Critère N	Nombre de nodules métastatiques	Taille des nodules
N1	1	a= micrométastases (<2mm ²) b=macrométastases (>2 mm ²)
N2	2-3	
N3	4 et +	
Critère M	Sites des métastases	
M1a	Cutané et sous-cutané	
M1b	Poumons	
M1c	Autres sites	

Table 1 : Classification TMN des mélanomes. Le critère T renseigne sur l'épaisseur et le taux d'ulcération et mitotique de la tumeur. Le critère N renseigne sur la présence de nodules métastatiques, leur nombre et leur taille. Le critère M renseigne sur la présence de métastases distantes et leur localisation (Source image⁶⁷).

Stade du mélanome	Critère T	Critère N	Critère M
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-4a	N1a-N2a	M0
IIIB	T1-4b	N1a—N2a	M0
	T1-4a	N1b-c	M0
IIIC	T1-4b	N1b-N2b	M0
IV	T1a-T4b	N1a-N3b	M1a-c

Table 2 : Classement des mélanomes en fonction de leur score TNM. Le classement TMN permet de classer les mélanomes selon leur gravité et ainsi de prédire le pronostic du patient.

5) Les traitements

Le traitement du mélanome cutané dépend du stade de ce dernier. En effet, les mélanomes de stade I sont principalement traités par résection chirurgicale, ceux de stade II et III par résection chirurgicale complémentée par l'immunothérapie et ceux de stade IV par résection chirurgicale complémentée par la chimiothérapie. Les mélanomes étant hautement résistants à la radiothérapie, cette technique est réservée aux soins palliatifs ou lorsque les métastases sont inaccessibles pour la résection chirurgicale⁶⁸.

5. 1. L'exérèse chirurgicale

L'exérèse chirurgicale vise à retirer la lésion et une fine bande de peau appelée marge de sécurité. La lésion est envoyée à un laboratoire d'anatomopathologie afin d'être analysée. Les ganglions peuvent également être excisés dans le cas de détection de micrométastases. Le taux de survie global à 5 ans est de 20% pour les patients atteints de mélanomes non métastatiques après résections chirurgicales^{57,69}.

5. 2. L'immunothérapie

Certaines immunothérapies ont montré des réponses complètes et durables pour un petit nombre de patients⁷⁰. Les immunothérapies principalement utilisées pour traiter les mélanomes sont l'IL-2, IFN- α et anti-CTLA-4. IL-2 est une cytokine nécessaire pour la prolifération et l'activation des lymphocytes T et des natural killers (NK) ainsi qu'à la libération d'autres cytokines comme TNF et IFN- γ ⁷⁰. De cette manière, le traitement de tumeurs par IL-2 permettrait de créer une réponse inflammatoire anti-tumorale. Cependant, uniquement les traitements à haute dose d'IL-2 ont montré des réponses durables. La thérapie à partir de hautes doses d'IL-2 fût acceptée en 1998 par l'administration américaine de contrôle des produits pharmaceutiques et alimentaires (FDA)⁶⁹. Lors d'une analyse portée sur 270 patients atteints de mélanomes traités par IL-2, le taux de réponses global était de 16%. Parmi ces 16%, 60% des réponses étaient complètes et 40% des réponses étaient durables⁷¹. L'immunothérapie par IL-2 comporte néanmoins une toxicité majeure, c'est pourquoi il est important de préalablement identifier les patients susceptibles de répondre à ce type de thérapie⁷².

L'immunothérapie par les interférons IFN- α favorise une réponse immunitaire anti-tumorale comme la thérapie IL-2. Cependant, la thérapie par IFN- α n'apporte pas plus de réponses positives que la thérapie IL-2 et est liée à une grande toxicité. Celle-ci est donc réservée pour les mélanomes de stade IV comme traitement adjuvant à la chimiothérapie et lorsqu'IL-2 ne démontre pas de réponse positive⁶⁹.

CTLA-4 est un récepteur localisé en surface des lymphocytes T qui, tout comme CD28, peut se lier au récepteur B7 sur la membrane plasmique des cellules présentatrices d'antigènes. De cette manière, en fonction de la liaison de CD28 ou CTLA-4, le signal agit respectivement de manière positive ou négative sur l'activité et la prolifération du lymphocyte T lié. La thérapie anti-CTLA4 empêche la liaison de CTLA-4 à B7 et favorise ainsi la prolifération des lymphocytes T⁷³. Le taux de réponses des patients traités par des anticorps anti-CTLA4 (ipilimumab ou tremelimumab) est similaire à celui observé lors du traitement avec IL-2 et IFN- α . Cependant, les effets secondaires observés avec cette thérapie semblent plus légers que ceux observés avec l'IL-2 et IFN- α ⁶⁸.

5. 3. La chimiothérapie

Des résultats décevants ont été démontrés par un grand nombre d'essais cliniques lors de traitements de mélanomes avec des agents chimiothérapeutiques. Le seul agent

chimiothérapeutique approuvé par la FDA est la dacarbazine⁶⁹. Par une série de réactions, la dacarbazine libère un agent alkylant très réactif pour l'ADN : CH_3^+ . Ce dernier est susceptible de méthyliser les guanines (G) de l'ADN. Cette modification, si elle n'est pas prise en charge par les systèmes de réparation de l'ADN, engendre le remplacement de la guanine modifiée (G) par une thymine (T) et plus tard la substitution $\text{G} : \text{C} \rightarrow \text{T} : \text{A}$ lors de la réplication de l'ADN. Ce phénomène est hautement mutagène⁵⁷. Des analyses ont démontré que seuls 4% des patients atteints de mélanomes atteignaient une réponse complète après un traitement à la dacarbazine. C'est pourquoi la chimiothérapie est réservée aux patients atteints de mélanomes de stade IV⁶⁹. Des essais cliniques ont été réalisés avec d'autres agents chimiothérapeutiques. Par exemple la témozolomide, un analogue de la dacarbazine. Cependant, cette molécule ne semble pas plus bénéfique que la dacarbazine. Des agents anti-microtubulaires comme le paclitaxel ou des agents alkylants comme la fotémustine et la carmustine montrent des résultats encourageants lors des essais cliniques. Ces molécules n'ont cependant pas été approuvées par la FDA^{57,69}.

Aucune chimiothérapie ne semble améliorer hautement la survie globale des patients atteints de mélanomes métastatiques. Malheureusement, le traitement de mélanomes métastatiques n'a plus évolué depuis 40 ans. Cependant, récemment, le traitement contre les mélanomes métastatiques a pu enfin progresser grâce au développement de thérapies ciblées⁷⁴.

5. 4. La thérapie ciblée

Le gène le plus fréquemment muté chez les patients atteints de mélanomes est BRAF. Parmi les patients portant ce gène muté, 74% portent une substitution de l'acide glutamique par une valine au codon 600 du gène engendrant une activité constitutive de la voie de signalisation MAPK⁷⁵. Vemurafenib et dabrafenib sont deux molécules inhibitrices ciblant BRAF V600E approuvées par la FDA⁷³. Ces nouveaux traitements ont montré de meilleures réponses que la dacarbazine lors d'essais cliniques. En effet, le taux de réponses objectives de 19% lors du traitement à la dacarbazine est passé à 53% lors du traitement à la dabrafenib. Néanmoins, en plus de la toxicité liée à ces traitements, certains patients ont développé un carcinome spinocellulaire secondaire. De plus, une résistance est rapidement observée chez les patients traités par ces deux inhibiteurs de BRAF⁷³. Afin de limiter l'activité constitutive de BRAF, d'autres protéines de la cascade MAPK, en aval de RAF, peuvent également être ciblées⁷³. Le tramétinib est une molécule inhibitrice ciblant MEK. Cette molécule montre des effets plus encourageants que la dacarbazine lors du traitement de mélanomes. De plus, le traitement de mélanomes avec cette molécule n'est pas lié au développement de néoplasmes secondaires et aucune résistance à ce traitement n'a encore été identifiée⁷³. La mutation de C-kit activant la voie de signalisation MAPK de manière constitutive a été identifiée dans 36% des mélanomes non familiaux. L'imatinib mésylate est un inhibiteur compétitif de plusieurs tyrosines kinases, dont C-Kit. Les essais cliniques de cette molécule montrent des résultats encourageants. Néanmoins, une résistance est également rapidement identifiée chez les patients traités avec l'imatinib⁷³. La thérapie ciblée est en plein essor, d'autres inhibiteurs de BRAF, MEK, C-kit ciblant différentes voies impliquées dans la progression du mélanome sont actuellement à l'essai et d'autres cibles pharmacologiques sont également recherchées⁷³.

6) La chimiorésistance du mélanome

La chimiorésistance est responsable du faible index thérapeutique lié au mélanome. La mélanogénèse et les ABC transporteurs semblent avoir un rôle majeur dans la chimiorésistance du mélanome⁷⁶.

La chimiorésistance dépendrait du stade de maturation des mélanosomes⁷⁷. Les cellules mélanotiques, riches en mélanosomes matures, semblent posséder une sensibilité plus élevée aux agents chimiothérapeutiques que les cellules amélanotiques, pauvres en mélanosomes matures. En effet, il a été démontré que les mélanosomes de stades II et III favorisaient la résistance aux agents chimiothérapeutiques et au contraire, que les mélanosomes de stade IV favorisaient la sensibilité à ces mêmes traitements. En fait, les mélanosomes matures (stade IV) semblent être responsables de l'induction d'une cytotoxicité, limitant la croissance cellulaire, par la libération de mélanine dans le cytoplasme. Au contraire, les mélanosomes précoces (stades II et III), semblent capturer les composés cytotoxiques et fusionner avec les lysosomes pour former un phagolysosome ainsi que dégrader les composés cytotoxiques (**Figure 8**). Afin de confirmer ce mécanisme, une étude a comparé la différence de sensibilité d'un type cellulaire issu de mélanomes et d'un type cellulaire issu de carcinomes à un même agent chimiothérapeutique. Par après, en couplant l'agent chimiothérapeutique à une sonde fluorescente, cette équipe a comparé la localisation de la molécule marquée au sein des deux types cellulaires. Chez les cellules de mélanomes, la molécule était observée dans le cytoplasme et non dans le noyau alors que chez les cellules de carcinomes, elle était majoritairement observée dans le noyau⁷⁷.

Ensuite, un co-marquage de l'agent chimiothérapeutique et des mélanosomes de stade II a été réalisé grâce à l'anticorps anti-HMb45, un marqueur spécifique des mélanosomes de stade II. Ce co-marquage a confirmé le fait que, au sein des cellules mélanotiques, le traitement était capturé dans les mélanosomes de stade II (**Figure 8**)^{77,78}. En fait, certains ABC transporteurs semblent être impliqués dans la capture de composés cytotoxiques au sein des mélanosomes de stade II et dans la chimiorésistance associée. Cependant, la localisation subcellulaire de ces derniers n'a pas encore été identifiée (**Figure 9**)⁷⁹.

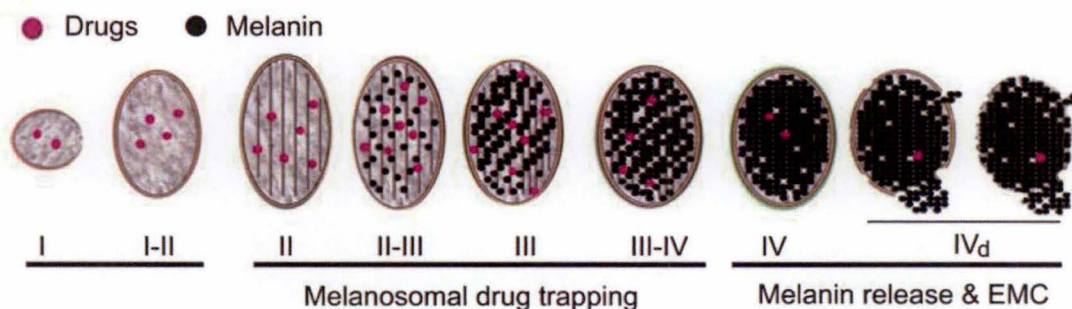


Figure 8 : Rôle de la mélanogénèse dans la chimiorésistance du mélanome. Implication des mélanosomes précoces dans la chimiorésistance des mélanomes par la capture des agents chimiothérapeutiques. Augmentation de la sensibilité aux agents chimiothérapeutiques suite à la libération de mélanine et intermédiaires cytotoxiques dans le cytoplasme par les mélanosomes matures (Source image⁷⁹).

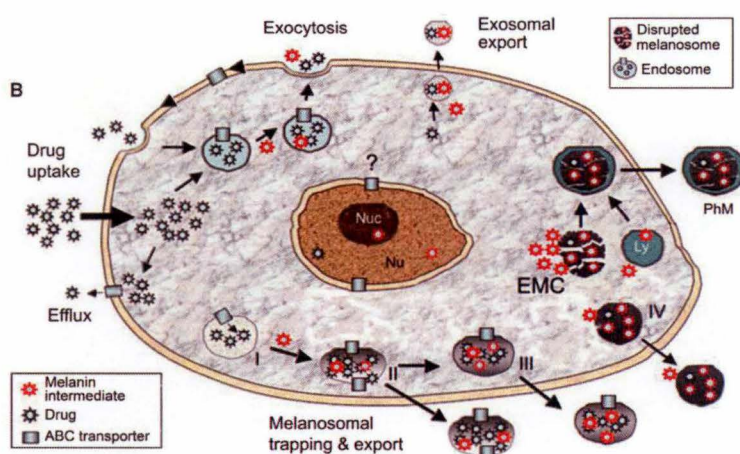


Figure 9 : Localisation possible des ABC transporteurs au niveau des endosomes, mélanosomes et lysosomes. La localisation des ABC transporteurs en membrane des endosomes, mélanosomes et lysosomes permettrait la capture et l'élimination des composés cytotoxiques. Les ABC transporteurs pourraient également être localisés au niveau de la membrane nucléaire afin d'éliminer les composés cytotoxiques du noyau et protéger le matériel génétique (source image⁷⁹).

7) Les ABC transporteurs

Cinquante-six gènes codant pour des ABC transporteurs ont été répertoriés chez les vertébrés. Cependant, seulement quarante-huit de ces gènes seraient fonctionnels chez l'homme⁸⁰. Les ABC transporteurs sont des transporteurs transmembranaires actifs qui transportent leur substrat contre le gradient de concentration aux dépens de l'ATP. La topologie typique de ces derniers est caractérisée de deux domaines de liaison à l'ATP (NBD) et de deux domaines transmembranaires (TMD) formant un seul nucléotide (**Figure 10**). Les domaines NBD sont constitués d'un walker A et d'un Walker B séparés par le motif de signature des ABC transporteurs, d'une séquence LSGGQ et des queues D, H et Q⁸¹. C'est le walker A qui lie l'ATP et c'est l'interaction entre le walker A et le walker B du premier NBD avec le motif de signature des ABC transporteurs et la queue D du deuxième NBD qui permet la dimérisation de ces derniers⁸²⁻⁸⁴. Les domaines TMD sont composés de 6 hélices transmembranaires formant un entonnoir transmembranaire responsable de la liaison et du transport actif du substrat⁸¹.

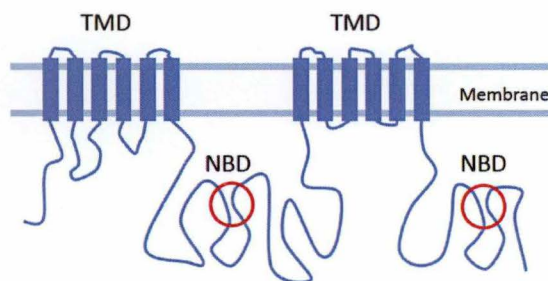


Figure 10 : Structure d'un ABC transporteur typique. Les ABC transporteurs typiques sont composés de deux domaines NBD liant les molécules d'ATP et de deux domaines TMD contenant 6 hélices transmembranaires s'assemblant pour former un entonnoir responsable de la liaison et du transport du substrat contre le gradient de concentration (source image⁸⁶).

Deux modèles ont été proposés pour expliquer le cycle catalytique des ABC transporteurs^{84,85}. Selon le premier modèle, la liaison du substrat au niveau des TMD engendre un changement de conformation augmentant l'affinité des walker A pour l'ATP. Deux molécules d'ATP se lient alors au niveau des walker A et permettent la dimérisation des deux NBD. Ce processus engendre un changement de conformation de perte d'affinité au sein des TMD, libérant le substrat. L'hydrolyse des deux molécules d'ATP apporte l'énergie nécessaire au retour à l'état initial du transporteur. Dans ce modèle, c'est la dimérisation des deux domaines NBD suite à la liaison de l'ATP qui permet le transport du substrat⁸⁴. Selon le deuxième modèle, le substrat a besoin de l'hydrolyse d'un ATP afin d'être transporté. En effet, suite à la liaison du substrat aux TMD, l'hydrolyse d'un ATP par les NBD engendre un changement de conformation des TMD libérant le substrat. La liaison et l'hydrolyse d'un deuxième ATP permettent le retour à l'état initial du transporteur (*Figure 11*)⁸⁵.

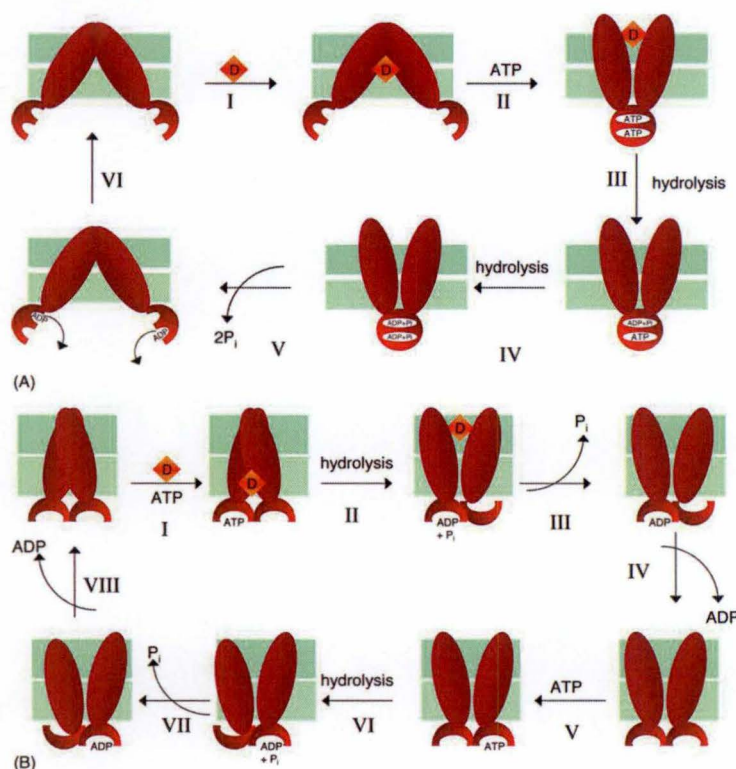


Figure 11 : Mécanisme de fonctionnement des ABC transporteurs. Il existe deux modèles. A) modèle selon lequel la dimérisation des deux domaines NBD permet le transport du substrat contre le gradient de concentration. B) Modèle selon lequel l'hydrolyse de l'ATP permet le transport du substrat contre le gradient de concentration (source image⁸¹).

ABCB1 est l'ABC transporteur de forme typique le plus caractérisé⁷⁶. Tous les ABC transporteurs ne possèdent pas une structure typique. Certains contiennent un domaine TMD additionnel composé de 5 segments transmembranaires (ABCC1-3, ABCC6 et ABCC10). D'autres, sont des demi-transporteurs composés d'un domaine TMD et d'un domaine NBD (ABCG2 et ABCD1)⁷⁶. Les demi-transporteurs seraient capables de s'assembler en

hétérodimères (deux transporteurs différents) ou homodimères (deux transporteurs identiques) pour être fonctionnels⁸⁰.

Les ABC transporteurs sont répartis en 7 familles, de la classe A à G en fonction de l'homologie de leur séquence⁸⁰. Les ABC transporteurs ont une variété de rôles au sein de la cellule. Certains d'entre eux régulent la perméabilité au niveau des barrières physiologiques telles que la barrière hémato-encéphalique, le placenta et la barrière hémato-testiculaire par l'efflux des composés toxiques. D'autres ABC transporteurs favorisent l'élimination des composés nocifs au niveau des organes d'élimination comme le foie et les reins ainsi que le transport de différents substrats comme les lipides, les protéines et les nucléotides⁷⁶.

L'importance de l'expression des ABC transporteurs a été démontrée dans la chimiorésistance de certains cancers, notamment le mélanome. En effet, ces protéines transmembranaires seraient impliquées dans le transport actif des agents chimiothérapeutiques administrés lors du traitement de patients atteints de mélanomes⁷⁶.

L'implication des ABC transporteurs dans la chimiorésistance par l'efflux des agents chimiothérapeutiques a été démontrée pour les ABC transporteurs suivants : ABCA2-3, ABCB1, ABCB4, ABCB5, ABCB11, ABCC1-6, ABCC10, ABCC11, ABCC12, ABCD1 et ABCG2⁷⁶.

7.1. ABCB5

ABCB5 fait partie de la famille B des ABC transporteurs⁸⁷. L'expression constitutive de différentes formes d'ABCB5 a été observée dans différents types cellulaires tels que les mélanocytes, les testicules, ainsi que dans les tissus mammaires et l'épithélium rétinien⁸⁸⁻⁹¹. Il existe une forme typique d'ABCB5 et deux isoformes, ABCB5 α et ABCB5 β ⁹¹. La forme typique d'ABCB5, 138 KDa, est spécifique des testicules. L'isoforme ABCB5 β est un transporteur tronqué de 90 KDa composé d'un domaine TMD et de deux domaines NBD dont un est incomplet puisqu'il ne possède pas de Walker A. L'isoforme ABCB5 α est une protéine soluble de 15 KDa plutôt associée à une fonction régulatrice qu'à une fonction de transport⁸⁷⁻⁹¹. Seule la forme typique d'ABCB5 serait fonctionnelle et capable de l'efflux de composés cytotoxiques⁹². En effet, il a été démontré que lorsque les cellules de mélanomes exprimant ce transporteur étaient traitées à la doxorubicine, ces dernières rejetaient la doxorubicine sur une période de temps de courte durée alors qu'aucun efflux de doxorubicine n'était observé chez les cellules de mélanomes traitées avec des inhibiteurs de la forme typique d'ABCB5⁸⁷.

L'expression de la forme typique d'ABCB5 semble être favorisée chez certains cancers tels que le mélanome malin, le cancer du sein, le cancer colorectal et le carcinome hépatocellulaire. En fait, sous cette forme, le transporteur ABCB5 est défini comme marqueur de progression tumorale chez le mélanome. Plus précisément, l'expression de ce dernier définit les cellules initiatrices du mélanome, cellules permettant la progression tumorale, et a été corrélée avec la coloration de mélanotransferrine, renseignant sur la progression tumorale^{93,94}.

La forme typique d'ABCB5 semble physiologiquement empêcher la fusion des cellules progénitrices menant à leur différenciation par hyperpolarisation de la membrane cellulaire. En effet, en contrecarrant la dépolarisation cellulaire, la forme typique d'ABCB5 favoriserait le phénotype cellule souche de la tumeur⁸⁸. La forme typique d'ABCB5 semble également jouer un rôle physiologique dans la mélanogenèse. En effet, ce transporteur semble moduler

l'homéostasie des mélanocytes en captant les intermédiaires cytotoxiques de la mélanine au sein d'organelles telles que les endosomes, lysosomes et mélanosomes. Ce dernier semble également être localisé dans la membrane nucléaire où il expulserait les composés cytotoxiques hors du noyau⁷⁹.

7. 2. Les ABC transporteurs : cibles pharmacologiques

ABCB1 fût le premier ABC transporteur identifié. ABCB1 est l'ABC transporteur impliqué dans la chimiorésistance le plus étudié⁷⁶. Les premières thérapies ciblant les transporteurs ABC ont donc été conçues pour cibler ce dernier. Ces thérapies impliquent des peptides ou des anticorps visant à bloquer l'activité de ce transporteur. Les premiers inhibiteurs d'ABCB1, le verapamil, la quinine et la Cyclosporine A, furent identifiés en 1981. La combinaison d'une molécule de première génération à haute dose à un traitement chimiothérapeutique intensif augmente le taux de rémission complète⁹⁵. Cela prouve que l'inhibition des ABC transporteurs est un projet prometteur contre la chimiorésistance⁹⁶. Des inhibiteurs d'ABCB1 de seconde génération, le valspodar et S9788 principalement, ont été générés. Ces molécules sont des dérivés des molécules de première génération⁹⁷. Néanmoins, le traitement avec ces dernières interfère avec le métabolisme et est lié à une cytotoxicité élevée suite à la diminution de la clairance⁹⁵⁻⁹⁷. Des inhibiteurs d'ABCB1 de troisième génération ont alors été conçus de manière à limiter toute interaction pharmacodynamique responsable de la cytotoxicité liée aux traitements précédants⁹⁶. Les inhibiteurs de troisième génération comprennent le laniquidar, l'oc144-093, le Zosuquidar et le tariquidar⁹⁷. La réduction de la masse tumorale a été démontrée lors du traitement avec ces dernières molécules⁹⁸. De plus, l'espérance de vie de souris xénograftes transplantées avec du tissu de tumeurs résistantes aux agents chimiothérapeutiques semble augmenter suite au traitement avec ces inhibiteurs d'ABCB1 de troisième génération. Les résultats des essais cliniques de phase I et II réalisés furent prometteurs, néanmoins ces derniers ont été interrompus à cause de la toxicité élevée de ces molécules⁹⁸.

Suite au manque de succès dans la thérapie visant les ABC transporteurs, d'autres approches ont été envisagées telles que l'utilisation de sondes antisens pour inhiber l'expression d'ABCB1. Le ciblage de transcrits d'ABCB1 par des ribozymes ou des ARN interférents. Ces techniques semblent peu cytotoxiques. Cependant, leur fonctionnement n'est pas encore parfaitement élucidé⁹⁸.

Le problème majeur reste toutefois l'inhibition du rôle physiologique des ABC transporteurs dans les tissus sains⁹⁸. Par exemple, il a été démontré que le knock-out d'ABCB1 favorisait la pénétration des agents chimiothérapeutiques dans le cerveau et que le knock-out d'ABCG2 conduisait à des effets myélotoxiques⁷⁸. L'inhibition d'ABCB5 pourrait mener à la mort des cellules saines suite à la cytotoxicité due à la mélanogenèse⁷⁹.

II) Objectifs du mémoire

Afin de comprendre le rôle d'ABCB5 dans la cellule saine et dans la tumeur, sa localisation subcellulaire doit être déterminée. Cependant, avant d'accomplir ce projet, un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5 doit être validé. L'objectif majeur de mon mémoire a consisté en la validation d'un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5 en western blot et en immunofluorescence. Afin d'atteindre cet objectif, mon mémoire s'est déroulé selon trois axes.

Le premier axe consistait en l'acquisition d'un contrôle négatif, primordial pour la validation d'un anticorps. Tout d'abord, différentes lignées cellulaires ont été infectées d'une part avec des particules lentivirales exprimant des shARNs dirigés contre le transporteur ABCB5, d'autre part avec des particules lentivirales exprimant une forme du gène ABCB5 porteuse d'une mutation STOP.

Le deuxième axe consistait en la validation d'un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5 en western blot. L'acquisition d'un contrôle négatif nous a permis de tester la spécificité de deux anticorps différents, l'un délivré par la société Rockland. Inc et l'autre par Abcam.

Le troisième axe consistait en la validation d'un anticorps permettant le marquage immunofluorescent du transporteur ABCB5. L'acquisition d'un contrôle négatif nous a permis de tester la spécificité d'un anticorps monoclonal fourni par notre collaborateur P. Ferrone (anticorps F2) en immunofluorescence.

III) Matériels et méthodes

1) Culture cellulaire

Les lignées cellulaires A375, UACC-257 (mélanome) et 293T (cellules embryonnaires du rein) ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Invitrogen, Carlsbad, USA) supplémenté par 10% de FBS (fetal bovine serum) et 1% de pénicilline/streptomycine (Invitrogen, Carlsbad, USA). Les cellules 63T (mélanome) ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium) (Invitrogen, Carlsbad, USA) supplémenté par 1M d'HEPES, 10% FBS, 1% de pénicilline/streptomycine et de 2 mM de L-Glut (Invitrogen, Carlsbad, USA). Les cellules A375, UACC-257 et 63T transduites ont été cultivées dans leur milieu respectif supplémenté par de la puromycine (3 µg/mL).

2) Acquisition d'une lignée cellulaire négative pour l'expression d'ABCB5

2.1. Transfection cellulaire avec des shARNs

Le vecteur lentiviral pGIPZ encodant une résistance à la puromycine, la GFP et un shARN dirigé contre les transcrits d'ABCB5 (clone Id : V2LSH_100516) (GE Healthcare, Diegem, Belgium) a été utilisé pour invalider l'expression cellulaire d'ABCB5. Ce même vecteur encodant un shARN ne ciblant aucun transcrit a également été utilisé comme contrôle négatif (clone Id : RHS4346) (GE Healthcare, Diegem, Belgium). Tout d'abord, les cellules d'emballage, 293T, ont étéensemencées en boîtes T25 de manière à être confluentes après 24H. Le lendemain, le milieu a été remplacé par du DMEM supplémenté par 10% de FBS sans antibiotique (Invitrogen, Carlsbad, USA). Après cette étape, les 293T ont été incubées avec 10 µL de l'agent de transfection Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1 µg du plasmide d'enveloppe pMD.G (Addgene, Cambridge, MA, USA), 1 µg du plasmide d'emballage psPAX2 (Addgene, Cambridge, MA, USA) et 1 µg de pGIPZ-shARN (GE Healthcare, Diegem, Belgium). Pour une transfection optimale, les cellules ont été incubées toute la nuit avec ce mix. Le lendemain, le milieu a été remplacé par du DMEM supplémenté par 10% de FBS, 1% de pénicilline et streptomycine pour une incubation durant toute la nuit. En parallèle, les cellules cibles (A375, UACC-257 et 63T), ont étéensemencées en boîtes T25 de manière à obtenir une confluence proche de 50 à 60% après 24H. Une fois cette confluence atteinte, les cellules cibles ont été infectées avec les particules virales. Pour cela, le milieu des cellules d'emballage a tout d'abord été récolté et passé dans un filtre de 45 µm. Ensuite, un mix contenant 4 mL du filtrat précédemment obtenu, 1 mL de DMEM et 40 µL de polybrène (Sigma, Diegem, Belgium) a été déposé sur les cellules cibles. Ces dernières ont été incubées toute la nuit dans ce mix. Pour terminer, les cellules exprimant de manière stable les shARNs ont été sélectionnées à la puromycine (3 µg/ml).

2.2. Transfection cellulaire

Les cellules 63T ont été transduites avec le vecteur viral CMV51p encodant ABCB5 tagué par un FLAG et une résistance à la puromycine. D'une part, ce vecteur encodait la forme sauvage du gène ABCB5 et correspondait au contrôle positif. D'autre part, le vecteur CMVp51 encodait une forme mutée du gène ABCB5 composée d'une mutation STOP (Q187*) (Frederick

National Laboratory, MD, USA). Cette mutation correspond à une mutation ponctuelle au niveau d'un nucléotide du codon 187 substituant ce codon qui code pour la glutamine en un codon stop, signal d'arrêt de la traduction. En parallèle, les cellules ont été transduites avec le vecteur viral pGIPZ codant pour la TurboGFP afin d'évaluer l'efficacité de l'infection lentivirale. Tout d'abord, les cellules d'emballage, 293T, ont étéensemencées en boîtes T25 de manière à être confluentes après 24H. Le lendemain, le milieu a été remplacé par du DMEM supplémenté par 10% de FBS sans antibiotique (Invitrogen, Carlsbad, USA). Après cette étape, les cellules 293T ont été incubées avec 10 μ L de l'agent de transfection Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1 μ g du plasmide d'enveloppe pMD.G (Addgene, Cambridge, MA, USA), 1 μ g du plasmide d'emballage psPAX2 (Addgene, Cambridge, MA, USA) et 1 μ g de pGIPZ-shARN (GE Healthcare, Diegem, Belgium). Pour une transfection optimale, les cellules ont été incubées toute la nuit avec ce mix. Le lendemain, le milieu a été remplacé par du DMEM supplémenté par 10% de FBS, 1% de pénicilline et streptomycine pour une incubation durant toute la nuit. En parallèle, les cellules cibles (63T), ont étéensemencées en boîtes T25 de manière à obtenir une confluence proche de 50 à 60% après 24H. Une fois cette confluence atteinte, les cellules cibles ont été infectées avec les particules virales. Pour cela, le milieu des cellules d'emballage a tout d'abord été récolté et passé dans un filtre de 45 μ m. Ensuite, un mix contenant 4 mL du filtrat précédemment obtenu, 1 mL de DMEM et 40 μ L de polybrène (Sigma, Diegem, Belgium) a été déposé sur les cellules cibles. Ces dernières ont été incubées toute la nuit dans ce mix. Pour terminer, elles ont été trypsiniées et transférées en boîtes T75 contenant du milieu DMEM supplémenté par de la puromycine (3 μ g/ml) afin de sélectionner les clones cellulaires exprimant de façon stable la forme sauvage ou mutée d'ABCB5. L'intégration du vecteur dans le génome des cellules cibles a été confirmée par séquençage (Beckman Coulter Genomics, Suarlée, Belgium) grâce à un couple d'amorces élaboré au laboratoire (Pf CTGATGGACTGGACATCACA ; Pr CCTCTTGGTCTGTCGTGCT

2.3. Contrôle du niveau d'expression des transcrits ABCB5 par PCR quantitative

Afin de quantifier le niveau d'expression des transcrits codant pour ABCB5, l'ARN total des différentes lignées cellulaires étudiées a tout d'abord été extrait par la méthode phénol-chloroforme. La phase aqueuse contenant l'ARN total a été prélevée et purifiée avec le kit « RNeasy Mini Kit » (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) ainsi que quantifiée en utilisant le lecteur de plaque SpectraMax i3. Ensuite, la transcription inverse a été réalisée à partir d' 1 μ g d'ARN dans un volume final de 20 μ L composé de tampon de transcription inverse 10X, d'amorces aléatoires 10X, d'un mix de dNTP (100 mM) et de l'enzyme transcriptase inverse (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Le mix ARN/tampon de réaction a été incubé 10 minutes à 25°C, 120 minutes à 37°C et 5 minutes à 85°C. Les ADNc ainsi obtenus ont été conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

L'expression d'ABCB5 a été quantifiée par PCR quantitative sur base des ADNc précédemment obtenus à l'aide des deux sondes Taqman suivantes : Hs03676539_m1 et Hs00698751_m1, respectivement nommées sonde 1 et sonde 2 (GE Healthcare, Diegem, Belgium). La quantification de l'expression du gène domestique 18S par la sonde HS99999901_1 (GE Healthcare, Diegem, Belgium) a permis la normalisation du niveau d'expression d'ABCB5 par rapport au niveau d'expression de ce gène. Pour la quantification, 100 ng d'ADNc ont été mélangés à 2X « Taqman Universal PCR Master Mix », 2X sondes Taqman et H2O sans nucléase (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Ce mix a été déposé dans une plaque 96 puits et analysé par « The real time PCR system viia 7 ». Le niveau d'expression d'ABCB5 a été défini par la méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

3) Validation d'un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5

3.1. Homogénéisation cellulaire

Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de culture T75 afin d'être confluentes après 24H. Le lendemain, les cellules ont été rincées deux fois au sucrose 0,25M avant d'être récupérées à l'aide d'un râteau. Les cellules récupérées ont été homogénéisées par 15 passages dans l'homogénéisateur de Dounce. La quantité de protéines a été dosée par le lecteur de plaque SpectraMax i3 selon la procédure du Kit Bicinchoninic Acid Protein Assay (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.2. Western blot

Les homogénats, contenant 30 µg de protéines, ont été déposés sur gel SDS-PAGE 8%. Les protéines ont été séparées selon leur poids moléculaire grâce à une électrophorèse SDS-PAGE à 120 V. Les membranes totales des cellules d'insectes Hi5 ont été utilisées comme contrôle négatif (Hi5-) et les membranes totales de ces mêmes cellules transduites avec le gène d'ABCB5 ont été utilisées comme contrôle positif (Hi5+). La migration terminée, les protéines ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose (Biorad, Hercules, CA, USA) durant 2 heures à 110V. Les membranes ont été bloquées avec du PBS-TWEEN 0,1%-LAIT 2% et incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire. Après cela, elles ont été lavées 3 x 10 minutes avec du PBS-TWEEN 0,1% et incubées avec l'anticorps secondaire pendant 45 minutes à température ambiante. Pour terminer, les membranes ont été lavées 3 x 20 minutes avant révélation. Afin de révéler les bandes immunoréactives, les membranes ont tout d'abord été incubées avec le révélateur « The Super Signal West Pico Chemiluminescent » (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) durant 5 minutes. Ensuite, les membranes ont été exposées à un film photographique durant des temps variés (GE Healthcare, Diegem, Belgium). Ces films ont été révélés par le processeur « Imager Fugifilm FM 100A desktop processor ».

Deux anticorps primaires ont été testés afin de révéler la forme protéique d'ABCB5 : un anticorps primaire polyclonal lapin (Rockland, Gilbertsville, PA, USA) dilué 1 :1000, identifié comme anticorps Rockland, et un anticorps primaire polyclonal chèvre dilué 1 :1000 (Abcam, Cambridge, UK), identifié comme anticorps Abcam. Les anticorps secondaires utilisés étaient un anticorps anti-lapin pour l'anticorps primaire polyclonal Rockland et un anticorps secondaire anti-chèvre pour l'anticorps polyclonal Abcam. Ces anticorps (Dako, Glostrup, Danemark) étaient couplés à la peroxydase de raifort « horseradish peroxydase » et ont été dilués 1 :1000.

3.3. Immunoprécipitation

La première étape de l'immunoprécipitation consistait à ajouter 40 µL de billes protéine G-agarose (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) et 800 µL de tampon de solubilisation 1x (20 mM MES, 0,1 M NaCl, 5mM EDTA, 1% TX-100 et 5% glycérol - pH7) par eppendorf. Ces derniers ont ensuite été centrifugés 3 x 3 minutes à 5000 rpm afin de laver les billes. La seconde étape consistait à fixer l'anticorps d'intérêt aux billes. Il est important de réaliser un contrôle de spécificité pour chaque anticorps utilisé. 1 µg d'anticorps polyclonal Abcam (Abcam, Cambridge, UK) ou d'IgG chèvre (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) ont été ajoutés dans des eppendorfs distincts contenant des billes préalablement lavées. Afin de fixer les anticorps aux billes, les deux mix ont été incubés sur roue tournante pendant 4H à 4°C. Un lavage a été effectué par deux centrifugations de 3 minutes à 5000 rpm pour éliminer les

anticorps non liés aux billes. La dernière étape consistait en la précipitation de la protéine d'intérêt. Pour cela, 1 mg d'homogénat préalablement centrifugé pendant 15 minutes à 14000 rpm et 500 μ L de tampon de solubilisation 1X supplémenté par des inhibiteurs de protéases (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) ont été ajoutés aux billes + anticorps. L'ensemble a été incubé sur roue tournante toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les billes ont été lavées avec du tampon de solubilisation 1x par 5 centrifugations de 1,5 minute à 8000 rpm. La protéine précipitée a été éluée de l'anticorps en ajoutant 30 μ L de tampon Laemmli 2X (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), avant de chauffer les échantillons 30 minutes à 37°C.

3.4. Marquage radioactif

Les cellules ont été déposées en plaques 6 puits afin d'être confluentes après 24H. Le lendemain, les cellules ont été rincées avec du DPBS (Invitrogen, Carlsbad, USA). Ensuite, du milieu DMEM 10% FCS supplémenté par 4mM de L-glut composé de méthionine et cystéine radioactives ^{35}S a été ajouté aux cellules (Perkin Elmer, Zaventem, Belgique). Les cellules ont été incubées dans ce milieu durant 4H à 37°C. Pendant ces 4H, les billes de protéine G- agarose ont été couplées à l'anticorps Abcam ou IgG chèvre comme décrit pour l'immunoprécipitation. Après les 4H d'incubation, les cellules ont été lavées trois fois avec du DPBS (Invitrogen, Carlsbad, USA) et récupérées en grattant les puits avec un râteau. Les cellules ont été centrifugées 1 minute à 13000 rpm à 4°C afin d'éliminer les cellules flottantes et les débris. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été resuspendues dans 500 μ L de tampon de solubilisation 1x glacé et supplémenté avec des inhibiteurs de protéases (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Le mix a été passé 5 fois à travers des seringues 21G, incubé 15 minutes sur glace et centrifugé 15 minutes à 14 000 rpm à 4°C. Le lysat cellulaire obtenu a été déposé sur les billes couplées à l'anticorps préalablement lavées avec du tampon de solubilisation 1x. Ce mix a incubé toute la nuit à 4°C. Le lendemain, comme décrit lors de l'immunoprécipitation, le mix billes-anticorps-lysate a été lavé avec du tampon de solubilisation 1x par 5 centrifugations 1,5 minutes à 8000 rpm. Lors du dernier lavage, l'entièreté du surnageant a été éliminée et 30 μ L de bleu, tampon laemmli 2X (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), ont été ajoutés. Les protéines immunoprécipitées ont été éluées des billes + anticorps en chauffant les eppendorfs 30 minutes à 37°C. Après cela, les eppendorfs ont été centrifugés afin de culoter les billes et le surnageant a été déposé sur gel de polyacrylamide 9%. Après migration, le gel a incubé dans une solution de fixation (30% méthanol, 10% acide acétique) durant 15 minutes à température ambiante. Pour terminer, le gel a été séché sur papier whatman. Le signal a été révélé par un cyclone phosphorimager après 24-48h (Packard Bioscience Compagny, Meriden, US).

3.5. Immunofluorescence

Les cellules ont été déposées sur lames couvre-objets en plaques 24 puits dans le but d'obtenir une confluence entre 50 et 70% après 24H. Le lendemain, les cellules ont été lavées au PBS (8 mM Na_2HPO_4 , 1.9 mM KH_2PO_4 , 2.7 mM KCl, 0.14 M NaCl), fixées avec du PFA-4% durant 10 minutes et perméabilisées avec du PBS-Triton 1% durant 5 minutes. Après perméabilisation, les cellules ont été lavées au PBS-BSA 1% et incubées avec l'anticorps primaire durant 2H à température ambiante. Ensuite, les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire durant 1H à température ambiante. Enfin, les cellules ont été incubées à l'obscurité avec le DAPI dilué 1 :1000 durant 5 minutes à température ambiante. Pour terminer, les cellules ont été lavées au PBS-BSA 1% et les lames couvre-objets ont été récupérées afin d'être déposées sur lames porte-

objets. Ce montage a été effectué avec du Moviol chauffé à 56°C. Les lames ont été stockées à 4°C jusqu'à leur observation au microscope confocal.

L'anticorps primaire utilisé était un anticorps monoclonal souris fourni par notre collaborateur, Professeur Ferrone (Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA). Cet anticorps est identifié comme l'anticorps F2. Suite aux recommandations du Professeur Ferrone, il a été dilué 1 :20. L'anticorps secondaire dilué 1 :1000 utilisé était un anticorps anti-souris conjugué à l'alexa-568 dirigé contre l'anticorps primaire monoclonal F2 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

IV) Résultats

1) Acquisition d'une lignée cellulaire négative pour l'expression d'ABCB5

Afin de valider un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5, l'obtention d'un contrôle négatif fiable est une étape primordiale. Dans le but de remplir cet objectif, trois lignées cellulaires différentes (63T, UACC-257 et A375) ont premièrement été infectées par des particules lentivirales dont le génome code pour des shARNs dirigés contre les transcrits d'ABCB5 (63T, UACC-257 et A375 shARNs). Les cellules ont également été infectées avec des particules lentivirales dont le génome code pour des shARNs contrôles, ne ciblant aucun transcrit (63T, UACC-257 et A375 NT shARNs). Une fois l'infection terminée, les cellules exprimant les divers shARNs ont été sélectionnées par traitement à la puromycine. Ensuite, le niveau d'expression des transcrits codant pour ABCB5 a été quantifié par RT-qPCR. Lors de cette technique, deux sondes Taqman différentes ont été utilisées (**Figure 12**). Le niveau d'expression des transcrits codant pour ABCB5 a été évalué par la méthode des delta-delta-Ct. Le Ct correspond au nombre de cycles nécessaires pour que le signal fluorescent dépasse le seuil de fluorescence définissant le bruit de fond pour chaque transcrit. Le Ct des transcrits codant pour ABCB5 a d'abord été normalisé avec le Ct des transcrits du gène 18S, le gène domestique, (Δ Ct). Ensuite le Δ Ct des cellules invalidées pour l'expression d'ABCB5 (shARNs) a été normalisé avec le Δ Ct des cellules contrôles (NT shARNs) ($\Delta\Delta$ Ct).

La RT-qPCR nous a révélé que le niveau d'expression des transcrits d'ABCB5 a pu être fortement inhibé au sein des cellules 63T infectées avec les particules lentivirales encodant des shARNs dirigés contre les transcrits ABCB5. En effet, le pourcentage de diminution d'expression était proche de 100% pour ces cellules. Au contraire, l'expression d'ABCB5 n'a pu être invalidée avec succès au sein des cellules A375 et UACC-257 infectées avec les particules lentivirales encodant des shARNs dirigés contre les transcrits ABCB5. En effet, au sein des cellules A375, l'expression des transcrits d'ABCB5 était encore supérieure à 80% lors de l'utilisation des deux sondes durant la RT-qPCR. Au sein des cellules UACC-257, l'expression des transcrits d'ABCB5 a pu être diminuée de moitié mais uniquement en utilisant la sonde 1 lors de la RT-qPCR, la sonde 2 révélant une augmentation supérieure à 2X du niveau d'expression des transcrits d'ABCB5 (**Figure 13**).

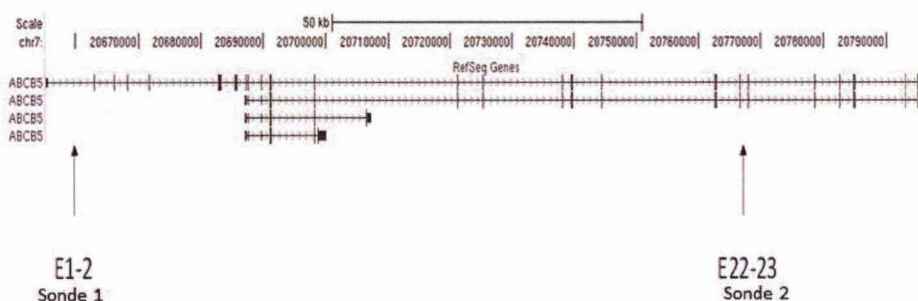


Figure 12 : Représentation des différents transcrits du gène codant pour ABCB5. Le gène codant pour ABCB5 est localisé sur le chromosome 7p21.1. Les flèches indiquent la position des deux sondes Taqman testées. Ces dernières chevauchent les exons 1-2 et 22-23.

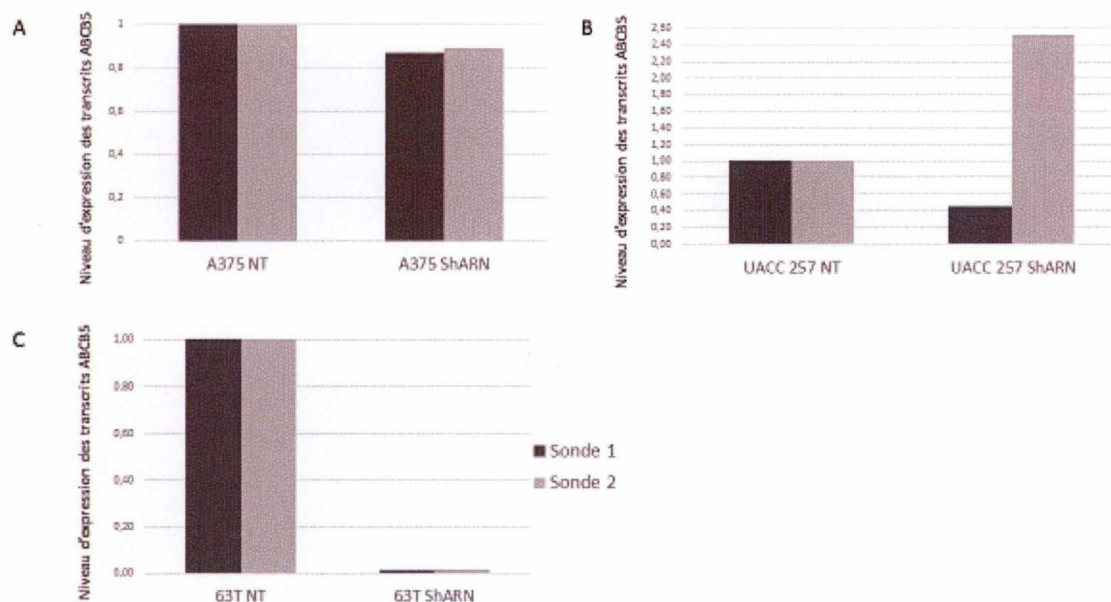


Figure 13 : Analyse du niveau d'expression des transcrits du gène codant pour ABCB5 au sein des cellules A375, UACC-257 et 63T. La RT-qPCR a été réalisée avec deux sondes Taqman différentes. La formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a été utilisée pour évaluer le niveau d'expression des transcrits ABCB5 pour chaque lignée cellulaire. L'expression des transcrits ABCB5 n'a pu être invalidée au sein des cellules A375 lors de l'utilisation des deux sondes (A). L'expression des transcrits ABCB5 a pu être diminuée au sein des UACC-257 mais uniquement avec la sonde 1 (B). Par contre, l'expression des transcrits ABCB5 a pu être invalidée avec succès au sein des cellules 63T avec les deux sondes (C).

Une technique alternative à l'utilisation d'ARNs interférents de type shARNs a été utilisée dans le but d'invalider l'expression d'ABCB5. Pour cela, les cellules 63T ont été transduites par infection virale avec le vecteur CMV51p, exprimant d'une part la forme sauvage du gène ABCB5 (contrôle positif) et d'autre part une forme mutée du gène ABCB5 porteuse d'une mutation STOP (Q187*) résultant en une forme tronquée et non-fonctionnelle de la protéine. Ces cellules ont respectivement été identifiées comme 63T ABCB5 et 63T Q187*. Au sein du vecteur CMV51p, la forme sauvage et la forme mutée d'ABCB5 étaient taguées par un FLAG. L'intégration du vecteur au sein du génome des cellules 63T a été confirmée en testant l'expression du FLAG par séquençage au sein du génome de ces dernières (résultats non montrés).

2) Validation d'un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5

2.1 Validation de l'anticorps polyclonal Rockland

Les deux contrôles négatifs préalablement obtenus ont premièrement permis la validation de l'anticorps polyclonal Rockland par western blot. Pour cela, une électrophorèse SDS-PAGE a été réalisée d'une part à partir des homogénats des cellules 63T transduites avec un shARN contrôle (63T NT shARN) ou dirigé contre les transcrits ABCB5 (63T shARN), d'autre part avec les homogénats des cellules 63T transduites avec le gène sauvage (63T ABCB5) ou muté d'ABCB5 (63T Q187*). Après transfert des protéines sur membranes, ces dernières ont été

incubées avec l'anticorps primaire polyclonal Rockland et un anticorps secondaire anti-lapin. La révélation a été réalisée avec le révélateur « super signal west PICO chemiluminescent substrate » (**Figure 14**). De cette manière, concernant l'utilisation d'ARNs interférents de type shARNs, une bande correspondant à la taille attendue de 138 KDa a été observée pour les homogénats extraits à partir des cellules exprimant les shARNs contrôles (63T NT shARN). Une bande de taille semblable mais d'intensité nettement diminuée a été également observée pour les homogénats extraits des cellules exprimant les shARNs dirigés contre ABCB5 (63T shARN). Concernant la transduction des cellules 63T avec la forme sauvage ou mutée du gène ABCB5, une bande a été observée à la taille attendue de 138 KDa pour les homogénats extraits des cellules 63T exprimant la forme sauvage d'ABCB5 (63T ABCB5). Une bande d'intensité très légère a également été observée à cette taille pour les homogénats extraits des cellules 63T exprimant la forme mutée d'ABCB5 (63T Q187*) (**Figure 14**).

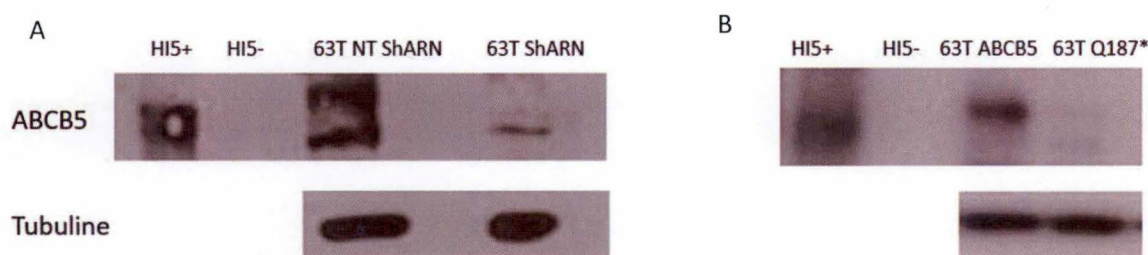


Figure 14 : Validation de l'anticorps polyclonal Rockland par western blot. Les membranes totales extraites des cellules d'insectes Hi5 ont servi de contrôle négatif (Hi5-). Les membranes totales issues de ces mêmes cellules transduites avec un vecteur codant pour ABCB5 ont servi de contrôle positif (Hi5+). Les révélations ont été effectuées avec le révélateur « super signal west PICO chemiluminescent substrate ». Un contrôle de charge a été réalisé par le marquage de la tubuline avec un anticorps primaire anti-tubuline (55 KDa). Une bande à la taille attendue de 138 kDa a été observée avec les homogénats extraits des cellules 63T NT shARN et 63T shARN. L'intensité de cette bande est nettement diminuée pour les 63T shARN (A). Une bande est observée à la taille attendue de 138 KDa pour les homogénats extraits des cellules 63T ABCB5. Une bande d'intensité très légère est observée à cette taille pour les homogénats extraits des cellules 63T Q187* (B).

2.2 Validation de l'anticorps polyclonal ABCAM

L'anticorps polyclonal Abcam n'a pu être validé par western blot. En effet, aucune bande correspondant à la taille attendue de 138 KDa n'a pu être révélée suite à l'utilisation de cet anticorps en western blot (résultats non présentés). Afin d'approfondir notre travail, le marquage radioactif suivi d'une révélation par autoradiographie a été effectué dans le but de tester la sensibilité de cet anticorps pour le transporteur ABCB5. Pour cela, les cellules UACC-257 confluentes ont tout d'abord été incubées dans un milieu contenant de la méthionine et cystéine ³⁵S radioactives. Durant le temps d'incubation, les billes de protéine G-agarose ont été couplées à l'anticorps correspondant (Abcam). Un contrôle de spécificité a été effectué en couplant les billes à un anticorps IgG chèvre. Une fois l'incubation terminée, les cellules ont été lysées et le lysat cellulaire a été déposé sur les billes couplées aux anticorps. Le lendemain, les protéines précipitées ont été éluées. Ensuite, une électrophorèse en condition non-dénaturante a été réalisée à partir de ces échantillons et directement après la migration, le gel a été plongé dans une solution de fixation avant d'être révélé par autoradiographie.

Une fine bande entre 100 et 150 kDa a été observée pour les cellules UACC-257 immunoprécipitées avec l'anticorps polyclonal Abcam. De plus, cette bande était absente pour les UACC-257 immunoprécipitées avec l'anticorps IgG. Ce résultat nous a confirmé la spécificité de l'anticorps polyclonal Abcam pour le transporteur ABCB5 en immunoprécipitation (*Figure 15*).

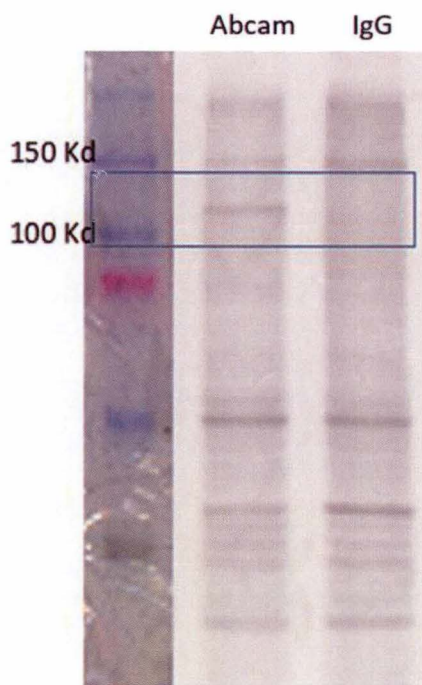


Figure 15 : Western blot réalisé à partir de lysats cellulaires des cellules UACC-257 marquées radioactivement immunoprécipités avec l'anticorps Abcam. Une bande a été observée entre 100 et 150 kDa. De plus, cette bande était absente lors du contrôle de spécificité, immunoprécipitation du lysat cellulaire des UACC-257 avec les IgG. Cette protéine pourrait correspondre au transporteur ABCB5.

2.3 Validation d'un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5 en immunofluorescence

Dans le but de valider un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5 en immunofluorescence, un marquage immunofluorescent a été réalisé au sein des cellules 63T avec l'anticorps primaire monoclonal F2, fourni par le Pr. Ferrone, et un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'alexa-568. L'intensité du signal fluorescent obtenue a été comparée entre les cellules transduites avec un shARN dirigé contre les transcrits d'ABCB5 (63T shARN) et les cellules transduites avec un shARN contrôle (63T NT shARN).

Suite aux résultats obtenus en western blot, nous nous attendions à une diminution du signal fluorescent pour les cellules 63T shARN par rapport à celui observé dans les cellules 63T NT shARN. Cependant, un signal diffus dans l'entièreté des cellules a tout d'abord été observé. Ensuite, aucune différence au niveau de l'intensité du signal n'a pu être mise en évidence entre ces deux lignées cellulaires (*Figure 16*).

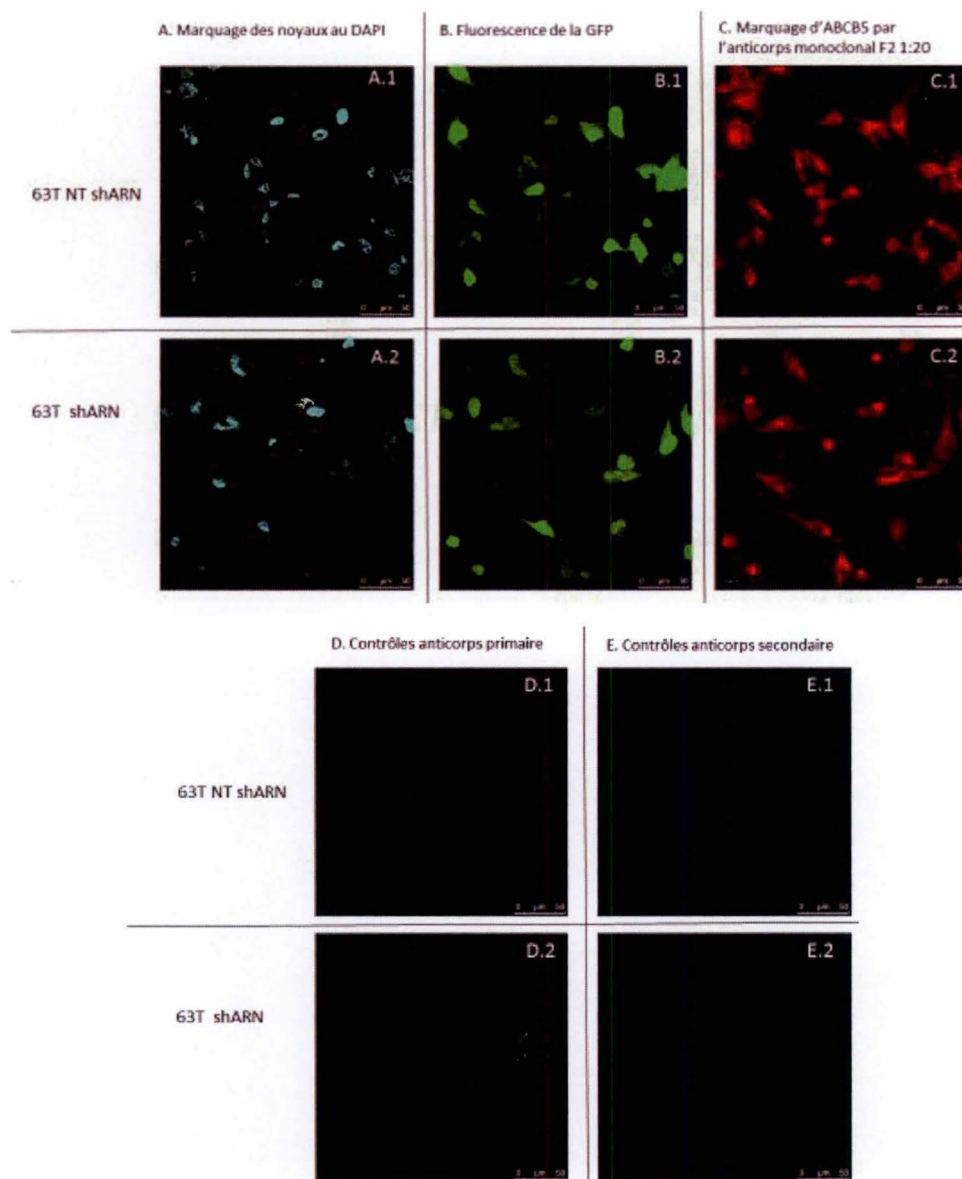


Figure 16 : Marquage immunofluorescent d'ABCB5 avec l'anticorps monoclonal F2 chez les cellules 63T NT shARN et les cellules 63T shARN. A) marquage des noyaux au DAPI chez les 63T NT shARN (A.1) et les 63T shARN (A.2). B) Fluorescence de la GFP chez les 63T NT shARN (B.1) et les 63T shARN (B.2). C) Marquage d'ABCB5 par l'anticorps monoclonal F2 dilué 1 :20 chez les 63T NT shARN (C.1) et les 63T shARN (C.2). D) Contrôle de l'anticorps primaire monoclonal F2 chez les cellules 63T NT shARN (D.1) et chez les 63T shARN (D.2). E) Contrôle de l'anticorps secondaire chez les cellules 63T NT shARN (E.1) et chez les 63T shARN (E.2).

V) Discussion

1) Acquisition d'une lignée cellulaire négative pour l'expression d'ABCB5

L'observation d'une bande à la taille attendue en western blot pour l'échantillon d'intérêt et l'absence de cette bande pour l'échantillon contrôle négatif est une indication positive concernant la spécificité de l'anticorps⁹⁹. L'acquisition d'un contrôle négatif était donc nécessaire pour la validation d'un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5.

Le contrôle négatif le plus fiable afin de valider un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5 était d'éteindre l'expression de ce dernier dans une lignée cellulaire l'exprimant de manière constitutive⁹⁹. L'utilisation d'ARNs interférents de type siARNs ou shARNs est une voie prometteuse pour éteindre l'expression d'un gène d'intérêt et est couramment utilisée en biologie pour cet usage^{100,101}. En fait, les siARNs et shARNs ont un mécanisme très similaire. Ce sont des molécules d'ARN doubles brins qui sont découpées par la protéine DICER et liées par le complexe RISC qui désapparie les deux brins et mène le brin anti-sens sur la séquence cible de l'ARNm complémentaire pour le dégrader ou inhiber sa transcription^{100,101}. L'usage de siARNs comporte différents désavantages. En effet, les siARNs sont directement délivrés dans le cytosol par transfection cellulaire. Une concentration trop élevée en siARNs dans le cytoplasme augmente considérablement le risque d'effets non-spécifiques, l'altération de l'expression d'autres gènes non-cibles et est responsable d'une toxicité élevée diminuant l'effet siARN^{100,101}. Le plus gros désavantage des siARNs reste toutefois la diminution de leur concentration puisqu'ils sont dilués lors de chaque division cellulaire. Un effet à long terme n'est donc pas envisageable avec ces derniers. L'étude d'un gène nécessite alors de multiples transfections de siARNs engendrant la diminution de la reproductibilité des résultats. Ces désavantages ne sont pas rencontrés lors de l'usage des shARNs. Contrairement aux siARNs, ces derniers sont délivrés dans le noyau et directement insérés dans le génome de la cellule par infection virale. L'expression stable des shARNs augmente la reproductibilité des résultats. Néanmoins, l'obtention d'une lignée cellulaire stable pour l'expression de shARNs ciblant un gène d'intérêt peut prendre plusieurs mois et est plus judicieuse que la transfection de cellules avec des siRNA^{100,101}.

Dans le but d'obtenir un contrôle négatif fiable et durable, la technique d'ARNs interférents de type shARNs a préférentiellement été choisie plutôt que la technique siARNs. En effet, les lignées cellulaires A375, UACC-257 et 63T sauvages exprimant ABCB5 de manière constitutive ont été infectées avec des particules lentivirales dont le génome code pour des shARNs ciblant les transcrits d'ABCB5 ou aucun transcrit (contrôle). Après sélection à la puromycine, l'expression du transporteur ABCB5 au sein des différentes lignées cellulaires testées a été quantifiée par RT-qPCR. L'invalidation de l'expression d'ABCB5 a été confirmée uniquement au sein des cellules 63T infectées avec des particules lentivirales encodant des shARNs dirigés contre les transcrits d'ABCB5. Une technique alternative aux ARNs interférents a également été utilisée dans le but d'acquérir un contrôle négatif. En effet, les cellules 63T ont été transduites par infection virale avec un vecteur composé du gène ABCB5 porteur d'une mutation STOP. Cette mutation perturbe la traduction et engendre majoritairement une forme tronquée de la protéine. La transduction des cellules 63T avec le même vecteur mais composé de la forme sauvage du gène ABCB5 a servi de contrôle positif. Le vecteur transduit étant porteur d'un FLAG, l'intégration de ce dernier au sein du génome

des cellules 63T a été confirmée par la présence du FLAG au sein du génome des cellules transduites par séquençage.

2) Validation d'un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5

2.1 Validation d'un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5 en western blot

Suite au succès de l'acquisition d'un contrôle négatif, la validation d'un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5 a été envisagée. Deux anticorps primaires polyclonaux différents ont été testés en western blot. Le premier a été fourni par la société Rockland. Inc et le second par la société Abcam.

Premièrement, concernant l'anticorps polyclonal Rockland, lors de la réalisation d'un western blot à partir des homogénats extraits des cellules 63T transduites avec des shARNs contrôles (63T NT shARN) ou des shARNs dirigés contre les transcrits ABCB5 (63T shARN), une bande à la taille attendue de 138 KDa a été obtenue dans les deux conditions. Cependant, l'intensité du signal chemiluminescent était nettement diminuée pour les homogénats extraits des cellules 63T shARN par rapport à celui obtenu pour les cellules 63T NT shARN. Ce résultat confirme les résultats obtenus par RT-qPCR. Lors de la réalisation d'un western blot à partir des homogénats extraits des cellules 63T transduites avec la forme sauvage (63T ABCB5) ou mutée du gène ABCB5 (63T Q187*), une bande à la taille attendue de 138 KDa a également été obtenue pour les homogénats extraits de ces deux lignées cellulaires. L'intensité du signal chemiluminescent était nettement diminuée pour les homogénats extraits des cellules 63T Q187* par rapport à celui obtenu pour les cellules 63T ABCB5. Ces résultats valident la spécificité de l'anticorps polyclonal Rockland pour le transporteur ABCB5 en western blot.

Deuxièmement, concernant l'anticorps polyclonal Abcam, aucune bande à la taille attendue de 138 KDa n'a pu être mise en évidence en western blot pour les homogénats extraits des cellules positives pour l'expression d'ABCB5 (63T sauvages et 63T NT shARN). Une technique alternative, la migration sur gel de produits d'immunoprécipitation marqués radioactivement, a alors été utilisée dans le but de tester la spécificité de cet anticorps pour le transporteur ABCB5. Suite à la révélation par autoradiographie, une bande a été observée entre 100 et 150 KDa. De plus, cette bande était absente au niveau du contrôle de spécificité (immunoprécipitation avec les IgG). Ces résultats indiquent que l'anticorps Abcam peut être utilisé pour précipiter le transporteur ABCB5 de manière spécifique. Afin de confirmer cette hypothèse, cette technique devrait être recommencée avec un contrôle négatif, les cellules 63T transduites avec des shARNs ciblant les transcrits ABCB5 ou avec une forme mutée d'ABCB5 (63T shARN ou 63T Q187*). L'obtention de résultats par autoradiographie et non en western blot ne peut pas être expliquée par l'augmentation de la sensibilité de la technique puisque le marquage chemiluminescent est plus sensible que la radioactivité¹⁰². En fait, la migration précédant la révélation de la radioactivité par autoradiographie, contrairement au western blot, se réalise en condition non-dénaturante. La spécificité de l'anticorps pour la forme native de la protéine et non pour la conformation dénaturée de cette dernière peut expliquer l'absence d'une bande à la taille attendue de 138 KDa lors des western blot et la présence de cette bande lors d'autoradiographies révélées avec l'anticorps Abcam. Par exemple, la survenue de modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation, peut engendrer un changement de conformation de la protéine ou la survenue d'interactions interprotéiques menant à la mise à disposition de l'épitope ciblé par l'anticorps. Dans ce cas, la réalisation d'un western blot, en condition dénaturante, ne permettra pas l'identification de la protéine d'intérêt par l'anticorps^{99,103}.

L'identification d'ABCB5 par chemiluminescent ou marquage radioactif est un avancement majeur pour la validation d'un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5. Cependant, afin de confirmer la spécificité des deux anticorps testés, une spectrométrie de masse à partir de ces dernier doit être réalisée. Afin de pouvoir réaliser cette technique, la coloration de la bande d'intérêt sur le gel SDS-PAGE, afin de pouvoir la découper et analyser son contenu protéique par la suite, doit tout d'abord être mise au point.

2.2 Validation d'un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5 en immunofluorescence.

Un marquage immunofluorescent avec l'anticorps monoclonal F2, fourni par notre collaborateur Ferrone, a été réalisé sur les cellules 63T transuies avec des shARNs dirigés contre les transcrits ABCB5 (63T shARN) ou contrôles (63T NT shARN). Nous nous attendions à une diminution de l'intensité du signal fluoresent au niveau des cellules 63T sh ARN par rapport à celui observé pour les cellules 63T NT shARN, comme observé en western blot. Néanmoins, un signal fluoresent a été observé pour ces deux lignées cellulaires et aucune distinction de l'intensité du signal n'a pu être mise en évidence entre ces dernières. Suite à cette observation nous avons conclu que nous obtenions un marquage aspécifique avec l'anticorps F2 et que ce dernier ne pouvait être utilisé pour déterminer la localisation subcellulaire d'ABCB5. Il serait donc interessant de réaliser le marquage immunofluorescent d'ABCB5 avec un autre anticorps dirigé contre ABCB5 au sein des cellules 63T. Dans le cas où aucun anticorps ne pouvait être validé, l'étiquetage d'ABCB5 par une sonde fluoresente serait une première alternative pour localiser ABCB5 dans la cellule¹⁰⁴. Néanmoins, cette alternative nécessite la production d'une lignée cellulaire exprimant de manière stable ABCB5 marqué par une sonde fluoresente. Cela demande un travail judicieux de plusieurs mois et ne semble pas être la technique la plus appropriée pour déterminer la localisation subcellulaire d'ABCB5. Premièrement, une surexpression de la protéine est inévitablement constatée lors de cette technique. Cette surexpression est responsable de l'obtention de faux-positifs mais aussi d'une cytotoxicité cellulaire liée à l'aggrégation de la protéine surexprimée¹⁰⁴. De plus, il a été démontré que le marquage d'une protéine avec une sonde florescente avait un impact sur la structure et la fonction de la protéine altérant ainsi le rôle physiologique de cette dernière et que cela engendrait également une relocalisation de la protéine¹⁰⁴. Une seconde alternative interessante, serait de développer une lignée cellulaire exprimant stablement ABCB5 tagué avec un Flag et de réaliser un marquage immunofluorescent avec un anticorps dirigé contre le FLAG. Cependant, cette alternative semble rencontrer les mêmes problématiques que celle précédemment proposée. Toutefois, l'impact sur la structure et la localisation de la protéine serait diminué lors de la fusion de la protéine d'intérêt avec des molécules de petites tailles comme un FLAG¹⁰⁵. Si ces techniques étaient envisagées pour identifier la localisation subcellulaire d'ABCB5, les risques d'une éventuelle relocalisation et destruction de la protéine doivent être considérés.

Finalement, la réalisation de fractionnements et sous-fractionnements avec un gradient à partir de la lignée cellulaire 63T sauvage et la réalisation d'un western blot à partir des différentes fractions avec l'anticorps polyclonal Rockland préalablement validé semble être une alternative prometteuse pour identifier la localisation subcellulaire d'ABCB5.

VI) Conclusion

En conclusion, l'objectif de mon travail consistait en la validation d'un anticorps dirigé contre le transporteur ABCB5 en western blot et en immunofluorescence.

Premièrement, un contrôle négatif a été acquis. En effet, cette étape était primordiale pour la validation d'un anticorps. Deux techniques ont été utilisées pour acquérir un contrôle négatif. La première consistait à infecter différentes lignées cellulaires par des particules lentivirales dont le génome code pour des shARNs ciblant les transcrits d'ABCB5. La seconde consistait à infecter les cellules 63T par des particules lentivirales dont le génome code pour le gène ABCB5 porteur d'une mutation STOP. Ces diverses techniques ont permis l'acquisition de deux contrôles négatifs utilisables pour la validation d'un anticorps ciblant la protéine étudiée.

Ensuite, l'anticorps polyclonal Rockland a pu être validé en western blot. Au contraire, l'anticorps polyclonal Abcam et l'anticorps F2 n'ont respectivement pas pu être validés en western blot et en immunofluorescence.

Grâce à ces dix mois de travail, la localisation subcellulaire d'ABCB5 peut être envisagée dans la continuité du projet. Afin d'atteindre cette étape, les perspectives du laboratoire seront prochainement focalisées sur la réalisation de fractionnements cellulaires et subcellulaires et en la révélation de ces derniers en western blot avec l'anticorps polyclonal Rockland, préalablement validé par spectrométrie de masse.

Bibliographie

1. Gartner, L.P., Hiatt, J.L., Bernaudin, J.F., Fajac, A & Lacave, R. Atlas en couleur d'histologie. Pradel Edition 3, 364 (2012).
2. Freinkel, R.K & Woodley, D.T. The biology of the skin. Parthenon Publishing, 332 (2001).
3. Natarajan, V.T., Ganju, P., Ramkumar, A., Grover, R & Gokhale, R.S. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. *Nature chemical biology* 10, 542-551 (2014).
4. Rass, K & Reichrath, J. UV damage and DNA repair in malignant melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Advances in experimental medicine and biology* 624, 162-178 (2008).
5. Samarasinghe, V & Madan, V. Nonmelanoma skin cancer. *Journal of cutaneous and aesthetic surgery* 5, 3-10 (2012).
6. Bandarchi, B., Ma, L., Navab, R., Seth, A & Rasty, G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatology research and practice* 2010, 1-9 (2010).
7. Garbe, C & Leiter, U. Melanoma epidemiology and trends. *Clinics in dermatology* 27, 3-9 (2009).
8. Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W., Comber, H., Forman, D & Bray, F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European journal of cancer* 49, 1374-1403 (2013).
9. Diffey, B.L. Human exposure to solar ultraviolet radiation. *Journal of cosmetic dermatology* 1, 124-130 (2002).
10. Miller, A.B. What causes cancer? What we know and what it means. FriesenPress (2014).
11. Polefka, T.G., Meyer, T.A., Agin, P.P & Bianchini, R.J. Effects of solar radiation on the skin. *Journal of cosmetic dermatology* 11, 134-143 (2012).
12. Holick, M.F. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. *Nutrition reviews* 66, 182-194 (2008).
13. Beersma, D.G & Gordijn, M.C. Circadian control of the sleep-wake cycle. *Physiology & behavior* 90, 190-195 (2007).
14. Seite, S & Fournanier, A.M. The benefit of daily photoprotection. *Journal of the American Academy of Dermatology* 58, 160-166 (2008).
15. Matsumura, Y & Ananthaswamy, H.N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and applied pharmacology* 195, 298-308 (2004).
16. De Grujil FR. wavelength dependancy of ultraviolet carcinogenesis in human and its revelance to risk assessments of stratopheric ozone depletion. *Cancer research* 53, 53-60 (1994).
17. Miller, A.J & Mihm, M.C.. Melanoma. *The New England journal of medicine* 355, 51-65 (2006).
18. Bertolotto, C. Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. *Scientifica* 2013, 1-22 (2013).
19. Erdei, E & Torres, S.M. A new understanding in the epidemiology of melanoma. *National institute of health* 10, 1811-1823 (2011).
20. Markovic, S.N., Erickson, L.A , Creagan, E.T. et al. Malignant melanoma in the 21st century, part 2: staging, prognosis, and treatment. *Mayo Clinic proceedings* 82, 490-513 (2007)
21. Bataille, V., Bishop, J.A., Sasieni, P., Swerdlow, A.J., Pinney, E., Griffiths, K & Cuzick, J. Risk of cutaneous melanoma in relation to the numbers, types and sites of naevi: a case-control study. *British journal of cancer* 73, 1605-1611 (1996).
22. Skin cancer foundation. naevus dysplasique et risque mélanome (page consultée en septembre 2015 disponible sur <http://www.skincancer.org/fr-FR/NAEVUS-DYSPLASIQUES>).
23. Ibrahim, N & Haluska, F.G. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annual review of pathology* 4, 551-579 (2009).
24. Ernfors, P. Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. *Experimental cell research* 316, 1397-1407 (2010).
25. Betters, E., Liu, Y., Kjaeldgaard, A., Sundstrom, E & Garcia-Castro, M.I. Analysis of early human neural crest development. *Developmental biology* 344, 578-592 (2010).
26. Cano, A., Pérez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F & Nieto, M.A. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature cell biology* 2, 76-83 (2000).

27. Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A & Tyminska, A. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy dermatologii i alergologii* 30, 30-41 (2013).
28. Abdel-Malek, Z.A., Kadekaro, A.L & Swope, V.B. Stepping up melanocytes to the challenge of UV exposure. *Pigment cell & melanoma research* 23, 171-186 (2010).
29. Plonka, P.M., Passeron, T., Brenner, M. et al. What are melanocytes really doing all day long...? *Experimental dermatology* 18, 799-819 (2009).
30. Sulaimon, S.S & Kitchell, B.E. The biology of melanocytes. *Veterinary dermatology* 14, 57-65 (2003).
31. Hearing, V.J. Determination of melanin synthetic pathways. *The Journal of investigative dermatology* 131, 8-11 (2011).
32. Schiaffino, M.V. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42, 1094-1104 (2010).
33. Hara, M., Yaar, M., Byers, H.R., Goukassian, D., Fine, R.E., Gonsalves, J & Gilchrist, B.A. Kinesin participates in melanosomal movement along melanocyte dendrites. *The Journal of investigative dermatology* 114, 438-443 (2000).
34. Park, H.Y., Kosmadaki, M., Yaar, M & Gilchrist, B.A. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cellular and molecular life sciences* 66, 1493-1506 (2009).
35. Scott, G., Leopardi, S., Printup, S & Madden, B.C. Filopodia are conduits for melanosome transfer to keratinocytes. *Journal of cell science* 115, 1441-1451 (2002).
36. Hirobe, T. Role of keratinocyte-derived factors involved in regulating the proliferation and differentiation of mammalian epidermal melanocytes. *Pigment cell research* 18, 2-12 (2005).
37. Busca, R & Ballotti, R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment cell research* 13, 60-69 (2000).
38. Scott, G., Leopardi, S., Printup, S., Malhi, N., Seiberg, M & Lapoint, R. Proteinase-activated receptor-2 stimulates prostaglandin production in keratinocytes: analysis of prostaglandin receptors on human melanocytes and effects of PGE2 and PGF2alpha on melanocyte dendricity. *The Journal of investigative dermatology* 122, 1214-1224 (2004).
39. Imokawa, G., Kobayashi, T., Miyagishi, M., Higashi, K & Yada, Y. The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis. *Pigment cell research* 10, 218-228 (1997).
40. Halaban, R., Tyrrell, L., Longley, J., Yarden, Y & Rubin, J. Pigmentation and proliferation of human melanocytes and the effects of melanocyte-stimulating hormone and ultraviolet B light. *Annals of the New York Academy of Sciences* 680, 290-301 (1993).
41. Grichnik, J.M., Burch, J.A., Burchette, J & Shea, C.R. The SCF/KIT pathway plays a critical role in the control of normal human melanocyte homeostasis. *The Journal of investigative dermatology* 111, 233-238 (1998).
42. Johnson, D.E & Williams, L.T. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Advances in cancer research* 60, 1-41 (1993).
43. Auernhammer, C.J & Melmed, S. Leukemia-inhibitory factor-neuroimmune modulator of endocrine function. *Endocrine reviews* 21, 313-345 (2000).
44. Okuda, K., Sanghera, J.S., Pelech, S.L., Kanakura, Y., Hallek, M., Griffin, J.D & Druker, B.J. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and steel factor induce rapid tyrosine phosphorylation of p42 and p44 MAP kinase. *Blood* 79, 2880-2887 (1992).
45. Cui, R., Widlund, H.R., Feige, E., Lin, J.Y., Fisher D.E. et al. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* 128, 853-864 (2007).
46. Kawaguchi, Y., Mori, N & Nakayama, A. Kit(+) melanocytes seem to contribute to melanocyte proliferation after UV exposure as precursor cells. *The Journal of investigative dermatology* 116, 920-925 (2001).
47. Hirobe, T. How are proliferation and differentiation of melanocytes regulated? *Pigment cell & melanoma research* 24, 462-478 (2011).
48. D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A & Scott, T. UV Radiation and the Skin. *International journal of molecular sciences* 14, 12222-12248 (2013).
49. Larousse médical. grain de beauté définition (page consultée le 16 mai 2016 sur <http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/n%3a6vus/14713>).

50. Omholt, K., Platz, A., Kanter, L., Ringborg, U & Hansson, J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clinical cancer research* 9, 6483-6488 (2003).
51. Clark, W.H., Elder, D.E., Guerry, D., Epstein, M.N., Greene, M.H & Van Horn, M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human pathology* 15, 1147-1165 (1984).
52. Braig, M & Schmitt, C.A. Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer research* 66, 2881-2884 (2006).
53. Hsu, M.Y., Wheelock, M.J., Johnson, K.R & Herlyn, M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *The journal of investigative dermatology* 1, 188-194 (1996).
54. Tan, X.D. Chang, H., Qu, X.W., Caplan, M., Gonzalez-Crussi, F & Hsueh, W. Platelet-activating factor increases mucosal permeability in rat intestine via tyrosine phosphorylation of E-cadherin. *British journal of pharmacology* 129, 1522-1529 (2000).
55. Danen, E.H., ten Berge, P.J., van Muijen, G.N., van 't Hof-Grootenboer, A.E., Brocker, E.B & Rüter, D.J. Emergence of alpha 5 beta 1 fibronectin- and alpha v beta 3 vitronectin-receptor expression in melanocytic tumour progression. *Histopathology* 24, 249-256 (1994).
56. Brooks, P.C., Strömblad, S., Sanders, L.C., von Schalscha, T.L., Aime, R.T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P & Cheresch DA. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 85, 683-693 (1996).
57. Chartrain, M. implication des cellules exprimant le transporteur abcb5 dans la chimiorésistance du mélanome métastatique. thèse, 1-168 (2011).
58. Girouard, S.D & Murphy, G.F. Melanoma stem cells: not rare, but well done. *Laboratory investigation. Journal of technical methods and pathology* 91, 647-664 (2011).
59. Monzani, E., Facchetti, F., Galmozzi, E., Corsini, E. et al. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential. *European journal of cancer* 43, 935-946 (2007).
60. Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F & Weissman, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111 (2001).
61. Bilanges, B., Argonza-Barrett, R., Kolesnichenko, M., Skinner, C., Nair, M., Chen, M & Stokoe, D. Tuberous sclerosis complex proteins 1 and 2 control serum-dependent translation in a TOP-dependent and -independent manner. *Molecular and cellular biology* 27, 5746-5764 (2007).
62. Wu, H., Goel, V & Haluska, F.G. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* 22, 3113-3122 (2003).
63. Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O & Kolch, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279-3290 (2007).
64. Maddodi, N & Setaluri, V. Role of UV in cutaneous melanoma. *Photochemistry and photobiology* 84, 528-536 (2008).
65. Balch, C.M., Gershenwald, J.E., Sondak, V.M. et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of clinical oncology. Official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 6199-6206 (2009).
66. Edge, S., Byrd, DR., Compton, CC. et al. AJCC cancer staging manual, New- York (2009).
67. Balch, C.M., Buzaid, A.C., Thompson, J.F. et al. New TNM melanoma staging system: linking biology and natural history to clinical outcomes. *Seminars in surgical oncology* 21, 43-52 (2003).
68. Garbe, C., Eigentler, T.K., Keilholz, U., Hauschild, A & Kirkwood, J.M. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *The oncologist* 16, 5-24 (2011).
69. Bhatia, S., Tykodi, S.S & Thompson, J.A. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology* 23, 488-496 (2009).
70. Malek, T.R & Bayer, A.L. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nature reviews, Immunology* 4, 665-674 (2004).
71. Atkins, M.B., Lotze, M.T., Rosenberg, S.A. et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *Journal of clinical oncology* 17, 2105-2116 (1999).

72. Smith, F.O., Downey, S.G., Rosenberg, S.A. et al. Treatment of metastatic melanoma using interleukin-2 alone or in conjunction with vaccines. *Clinical cancer research* 14, 5610-5618 (2008).
73. Karimkhani, C., Gonzalez, R & Dellavalle, R.P. A review of novel therapies for melanoma. *American journal of clinical dermatology* 15, 323-337 (2014).
74. Eggermont, A & Robert, C. New drugs in melanoma: it's a whole new world. *European journal of cancer* 47, 2150-2157 (2011).
75. Long, G.V., Menzies, A.M., Kefford, R.F. et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology* 29, 1239-1246 (2011).
76. Gillet, J.P., Efferth, T & Remacle, J. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. *Elsevier* 2, 237-262 (2007).
77. Chen, K.G., Leapman, R.D., Gottesman, M.M. et al. Influence of melanosome dynamics on melanoma drug sensitivity. *Journal of the National Cancer Institute* 101, 1259-1271 (2009).
78. Chen, K.G., Valencia, J.C., Gottesman, M.M. et al. Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 9903-9907 (2006).
79. Chen, K.G., Valencia, J.C., Gillet, J.P., Hearing, V.J & Gottesman, M.M. Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma. *Pigment cell & melanoma research* 22, 740-749 (2009).
80. Dean, M & Annilo, T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annual review of genomics and human genetics* 6, 123-142 (2005).
81. Ambudkar, S.V., Kim, I.W & Sauna, Z.E. The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 27, 392-400 (2006).
82. Hopfner, K.P., Karcher, A., Shin, D.S., Craig, L., Arthur, L.M., Carney, J.P & Tainer J.A. Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* 101, 789-800 (2000).
83. Smith, P.C., Karpowich, N., Millen, L., Moody, J.E., Rosen, J., Thomas, P.J & Hunt J.F. ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Molecular cell* 10, 139-149 (2002).
84. Higgins, C.F & Linton, K.J. The ATP switch model for ABC transporters. *Nature structural & molecular biology* 11, 918-926 (2004).
85. Sauna, Z.E & Ambudkar, S.V. Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes. *The Journal of biological chemistry* 276, 11653-11661 (2001).
86. Kavishe, R.A., van den Heuvel, J.M., van de Vegte-Bolmer, M., Luty, A.J., Russel, F.G & Koenderink, J.B. Localization of the ATP-binding cassette (ABC) transport proteins PfMRP1, PfMRP2, and PfMDR5 at the Plasmodium falciparum plasma membrane. *Malaria journal* 8, 205 (2009).
87. Moitra, K., Scally, M., McGee, K., Lancaster, G., Gold, B & Dean, M. Molecular evolutionary analysis of ABCB5: the ancestral gene is a full transporter with potentially deleterious single nucleotide polymorphisms. *PloS one* 6, 1-18 (2011).
88. Frank, N.Y., Pendse, S.S., Lapchak, P.H., Margaryan, A., Shlain, D., Doeing, C., Sayegh, M.H & Frank M.H. Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *The Journal of biological chemistry* 278, 47156-47165 (2003).
89. Frank, N.Y., Margaryan, A., Frank, M.H. et al. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer research* 65, 4320-4333 (2005).
90. Huang, Y., Anderle, P., Sadée, W. et al. Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer research* 64, 4294-4301 (2004).

91. Chen, K.G., Szakács, G., Gottesman M.M. et al. Principal expression of two mRNA isoforms (ABCB 5alpha and ABCB 5beta) of the ATP-binding cassette transporter gene ABCB 5 in melanoma cells and melanocytes. *Pigment cell research* 18, 102-112 (2005).
92. Keniya, M.V., Holmes, A.R., Cannon, R.D. et al. Drug resistance is conferred on the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* by expression of full-length melanoma-associated human ATP-binding cassette transporter ABCB5. *Molecular pharmaceutics* 11, 3452-3462 (2014).
93. Schatton, T., Murphy, G.F., Frank, M.H. et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 451, 345-349 (2008).
94. Frank, N.Y., Kho, A.T., Gussoni, E. et al. Regulation of myogenic progenitor proliferation in human fetal skeletal muscle by BMP4 and its antagonist Gremlin. *The Journal of cell biology* 175, 99-110 (2006).
95. Wattel, E., Solary, E., Fenaux, P. et al. Quinine improves results of intensive chemotherapy (IC) in myelodysplastic syndromes (MDS) expressing P-glycoprotein (PGP). *Advances in experimental medicine and biology* 457, 35-46 (1999).
96. Szakacs, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C & Gottesman, M.M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature reviews. Drug discovery* 5, 219-234 (2006).
97. Wu, C.P., Calcagno, A.M & Ambudkar, S.V. Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies. *Current molecular pharmacology* 1, 93-105 (2008).
98. Dantzig, A.H., Law, K.L., Cao, J & Starling, J.J. Reversal of multidrug resistance by the P-glycoprotein modulator, LY335979, from the bench to the clinic. *Current medicinal chemistry* 8, 39-50 (2001).
99. Bordeaux, J., Welsh, W.A., Rimm, L.D. et al. Antibody validation. *National Institut of health*, 48 (3). 197-209. (2010)
100. Moore, C.B., Guthrie, E.H., Huang, M.T & Taxman, D.J. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods in molecular biology* 629, 141-158 (2010).
101. Vankoningsloo, S. Gene expression silencing with 'specific' small interfering RNA goes beyond specificity - a study of key parameters to take into account in the onset of small interfering RNA off-target effects. *The FEBS journal* 275, 2738-2753 (2008).
102. J. Osborn. A review of radioactive and non-radioactive-based techniques used in life science application-Part I: Blotting techniques. *Life sciences* 6, 1-4 (2000)
103. Willingham, M.C & Bhalla, K. Transient mitotic phase localization of bcl-2 oncoprotein in human carcinoma cells and its possible role in prevention of apoptosis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 42, 441-450 (1994)
104. Brazelton, T.R & Blau, H.M. Optimizing techniques for tracking transplanted stem cells in vivo. *Stem cells* 23, 1251-1265 (2005).
105. Moore, I & Murphy, A. Validating the location of fluorescent protein fusions in the endomembrane system. *The Plant cell* 21, 1632-1636 (2009).